

# **ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΟΙΝΟΥ  
ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ



**ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΛΩΝΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ  
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΤΣΑΓΓΑΡΑΤΟΣ Γ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΟΙΝΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΑ»  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΛΚΟΟΛΟΥΧΩΝ ΠΟΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΝΟΛΟΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΚΛΩΝΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ  
ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ**

**STUDY OF OENOLOGICAL POTENTIAL OF VINE CLONES OF GREEK  
VARIETIES**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Γ. ΤΣΑΓΓΑΡΑΤΟΣ

ΚΟΤΣΕΡΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Κοτσερίδης Γεώργιος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Καλλίθρακα Σταματίνα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Γαρδέλη Χρυσανγή**, Επίκουρη Καθηγήτρια Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη του οινολογικού δυναμικού δύο κλώνων για πέντε βασικές ελληνικές ποικιλίες. Το πειραματικό μέρος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι ποικιλίες και οι κλώνοι τους που μελετήθηκαν είναι: το Ασύρτικο (E11, 16), το Μοσχοφίλερο (E26, E27), ο Ροδίτης (02E1E21, 25E16), το Αγιωργίτικο (03E40, 41E47) και το Ξινόμαυρο (19, E2E30).

Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στις ράγες/γλεύκος και στους οίνους. Στις ράγες/γλεύκος έγιναν οι κλασσικές αναλύσεις, μέτρηση του αφομοιώσιμου αζώτου και μετρήσεις που αφορούσαν τα ολικά φαινολικά, τις ανθοκυάνες και τις ταννίνες για τις ερυθρές ποικιλίες. Στους οίνους έγιναν οι κλασσικές αναλύσεις, μετρήσεις ολικών φαινολικών, ανθοκυανών και τανινών για τους ερυθρούς οίνους, καθώς και τεστ ταχείας αμαύρωσης για τους λευκούς.

Με βάση τα αποτελέσματα των δύο συναπτόν ετών που πραγματοποιήθηκε η μελέτη (2018 και 2019) παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των κλώνων των υπό μελέτη ποικιλιών.

Η πειραματική αυτή έρευνα πραγματοποιήθηκε για δεύτερη συναπτή χρονιά, όμως για να υπάρξουν εμπειριστατωμένα αποτελέσματα που θα συμβάλουν στην εφαρμογή της κλωνικής επιλογή, κρίνεται απαραίτητο να επαναληφθεί η έρευνα και τις επόμενες χρονιές.

**Λέξεις/Φράσεις κλειδιά:** Ασύρτικο, Μοσχοφίλερο, Ροδίτης, Αγιωργίτικο, Ξινόμαυρο, κλώνοι, ράγες/γλεύκος, οίνοι, κλασσικές αναλύσεις, ολικά φαινολικά, ανθοκυάνες, τανίνες, τεστ ταχείας αμαύρωσης.

## ABSTRACT

The aim of this master thesis was to study the oenological potential of two different clones for 5 main Greek varieties. The experimental part took place at the Laboratory of Enology and Alcoholic Drinks of the Department of Food and Nutrition Science of Agricultural University of Athens. The varieties of grapes and their clones studied are: Assyrtiko (E11, 16), Moschofilero (E26, E27), Roditis (02E1E21, 25E16), Agiorgitiko (03E40, 41E47) and Xinomavro (19, E2E30).

The measurements were conducted on the berries/must and the wines. Classical wine analyses were done in grape must along with the measurement of yeast assimilable nitrogen and of total phenolics, anthocyanins and tannins for the red varieties. The wines were also subjected to classical analyses besides the measurements of total phenolic, anthocyanins and tannins (red wines), as well as browning test analysis were done for white wines.

Concerning the results, of the two consecutive years (2018 and 2019) of this study statistically significant differences were observed on the qualitative characteristics among the clones of the varieties.

This experimental study has been done for the second consecutive vintage but in order to have established data that could contribute in clonal selection it is mandatory to repeat this research on the upcoming vintages.

**Keywords:** Assyrtiko, Moschofilero, Roditis, Agiorgitiko, Xinomavro, clones, berries/must, wines, classical analysis, total phenolics, anthocyanins, tannins, browning test.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Γεώργιο Κοτσερίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Οινολογίας, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του στο ερευνητικό και πειραματικό κομμάτι, καθώς και στην συγγραφή και διόρθωση της μεταπτυχιακής διατριβής, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε όλο αυτό τον καιρό και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.
- Την κ. Σταματίνα Καλλίθρακα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Οινολογίας, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε στην διόρθωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, καθώς και για την συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.
- Την κ. Νίκη Προξενιά, ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου της Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της στο χώρο του εργαστηρίου και την ψυχολογική της υποστήριξη κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής
- Τη Μαρία Ιωάννα Ξενιά, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου της Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών, του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για την πολύτιμη βοήθειά της στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας.

## Περιεχόμενα

1.1 Vitis vinifera L. ....	9
1.2 Τα μέρη της ράγας και η σύνθεση της.....	9
1.3 Φαινολικά συστατικά .....	11
1.3.1 Μη φλαβονοειδείς ενώσεις .....	13
1.3.2 Φλαβονοειδείς ενώσεις .....	15
1.3.2.1 Φλαβονόλες.....	15
1.3.2.2 Φλαβανόνες.....	16
1.3.2.3 Φλαβανόλες.....	16
1.3.2.4 Κατεχίνες.....	17
1.3.2.5 Προκυανιδίνες .....	18
1.3.2.6 Ανθοκυάνες.....	19
1.3.2.7 Ταννίνες .....	22
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την φαινολική σύσταση των ραγών.....	25
1.5 Κλωνική επιλογή.....	27
1.6 Αμπελογραφία.....	30
1.6.1 Ασύρτικο .....	30
1.6.2 Μοσχοφίλερο .....	31
1.6.3 Ροδίτης.....	31
1.6.4 Αγιωργίτικο .....	32
1.6.5 Ξινόμαυρο .....	32
Κεφάλαιο 2: Υλικά και μέθοδοι.....	32
2.1 Σχεδιασμός και στόχος του πειράματος .....	33
2.2 Πρωτόκολλο οινοποίησης.....	34
2.3 Αναλύσεις ραγών.....	35
2.3.1 Προσδιορισμός αφομοιώσιμου αζώτου.....	35
2.2.3.1 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου .....	36

2.2.3.2 Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων .....	36
2.3.2 Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαινολικών συστατικών .....	36
2.3.3 Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών, περιεκτικότητας ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών.....	38
2.4 Αναλύσεις οίνων .....	39
2.4.1. Κλασσικές αναλύσεις στους οίνους .....	39
2.4.1.1. Προσδιορισμός ολικής και ενεργού οξύτητας (pH) .....	39
2.4.1.2 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας .....	39
2.4.1.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων .....	40
2.4.1.4 Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου .....	40
2.4.2 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και ταννινών.....	40
2.4.2.1 Προσδιορισμός Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) .....	40
2.4.2.2. Μέθοδος Folin – Ciocalteu .....	41
2.4.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με δέσμευση από πρωτεΐνες (Harbertson J., <i>et al.</i> , 2003).....	41
2.4.2.4 Μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με την προσθήκη μεθυλ-κυτταρίνης (methyl-cellulose) (Sarneckis C., <i>et al.</i> , 2006) .....	42
2.4.3 Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών και ανθοκυανών.....	43
2.4.3.1 Χρωματικά χαρακτηριστικά.....	43
2.4.3.2 Χρωματικοί δείκτες Somers.....	44
2.4.3.4 Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	46
2.4.4 Τεστ ταχείας αμάρωσης.....	47
2.4.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων .....	48
Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα.....	48
3.1 Αποτελέσματα αναλύσεων στις ράγες.....	49
3.1.1 Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN).....	49
3.1.2 Ολικές ανθοκυάνες και φαινολικά συστατικά (Pland).....	50

3.1.3 Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών, περιεκτικότητας ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών (Glories).....	53
3.2 Αποτελέσματα αναλύσεων στους οίνους.....	57
3.2.1 Κλασσικές αναλύσεις .....	57
3.2.1.1 Ολική και ενεργός οξύτητα (pH).....	58
3.2.1.2 Πτητική οξύτητα.....	60
3.2.1.3 Ανάγοντα σάκχαρα.....	61
3.2.1.4 Αλκοολικός τίτλος.....	62
3.2.2 Φαινολικά συστατικά και ταννίνες.....	62
3.2.2.1 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ).....	62
3.2.2.2 Ολικά Φαινολικά (Folin Ciocalteu).....	63
3.2.2.3 Ταννίνες με πρόσδεση από πρωτεΐνες (BSA).....	64
3.2.2.4 Ταννίνες με κατακρήμνιση από μέθυλ-κυτταρίνη (MCP).....	65
3.2.3 Χρωματικά χαρακτηριστικά και ανθοκυάνες .....	66
3.2.3.1 Χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση και απόχρωση).....	66
3.2.3.2 Χρωματικοί δείκτες Somers.....	68
3.2.3.3 Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	72
3.2.4 Τεστ ταχείας αμαύρωσης.....	74
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα.....	72
Παράρτημα.....	76
Βιβλιογραφία.....	85



# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

## 1.1 *Vitis vinifera* L.

Ένα από τα σημαντικότερα καλλιεργούμενα φυτά στη γη είναι η άμπελος η οιοφόρος (*Vitis vinifera* L.), το οποίο είναι το μοναδικό ευρωπαϊκό είδος του γένους *Vitis* της οικογένειας των Αμπελιδών (*Vitaceae*). Το είδος αυτό έκανε την εμφάνιση του προς το τέλος της τριτογενούς γεωλογικής περιόδου, σύμφωνα με απολιθώματα που έχουν βρεθεί σε περιοχές της Δυτικής Ασίας, της Ανατολικής Μεσογείου και της Ευρώπης. Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της αμπέλου ίσως εφαρμόστηκε στην μινωική Κρήτη περίπου το 3.000 π.Χ. Σήμερα, η καλλιέργεια της αμπέλου επεκτείνεται και στις πέντε ηπείρους με συνολική έκταση 7.449.000 εκτάρια. Στις πρώτες τρεις θέσεις βρίσκονται οι Ισπανία, Κίνα και Γαλλία με εκτάσεις 969.000 εκταρίων, 875.000 εκταρίων και 793.000 εκταρίων αντίστοιχα, ενώ η Ελλάδα καταλαμβάνει τη δέκατη έβδομη θέση με 106.000 εκτάρια. (OIV, 2018).

Η άμπελος είναι πολυετές και φυλλοβόλο φυτό. Το υπόγειο μέρος αποτελείται από την ρίζα, ενώ το υπέργειο από τον κορμό, τους βραχίονες, τις κληματίδες, τα φύλλα, τους οφθαλμούς, τις ταξιανθίες-σταφυλές και τους έλικες. Οι σταφυλές αποτελούνται από τους βόστρυχες (3-7% του βάρους της σταφυλής) και τις ράγες (93-97% του βάρους της σταφυλής). Οι βόστρυχοι είναι υπεύθυνοι για το κράτημα των ραγών και τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών σ αυτές. Η χημική σύσταση του βοστρύχου είναι νερό (65-85% ανάλογα με τον βαθμό ωρίμανσης), τανίνες (2-4%), ανόργανες ουσίες (2-2,5%), αζωτούχες ουσίες (1-1,5%), οργανικά οξέα (0,5-2%), ρητίνες (1%), ενώ υπάρχει και ελάχιστη περιεκτικότητα σε σάκχαρα γύρω στο 1% (Σουφλερός, 2000).

## 1.2 Τα μέρη της ράγας και η σύνθεση της

Η ράγα αποτελεί τον καρπό της αμπέλου και αποτελείται από ομάδες ιστών που περιβάλλουν τα γίγαρτα, τα οποία αποτελούν τα αναπαραγωγικά όργανα της αμπέλου. Οι ομάδες ιστών αυτές χωρίζονται στο εξωκάρπιο (φλοιός), το μεσοκάρπιο (σάρκα) και το ενδοκάρπιο (η περιοχή γύρω από τα γίγαρτα) (Ribereau- Gayon P., *et al.*, 1998).

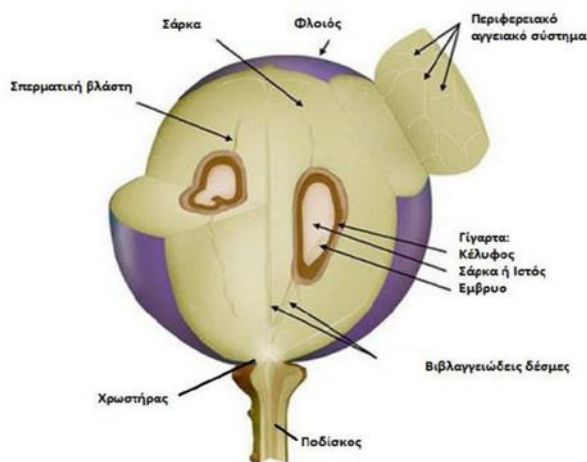
Ο φλοιός αποτελεί το 10-20% της ράγας και συντελείται από τρία στρώματα: την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και το υπόδημα. Η εφυμενίδα βρίσκεται στο εξωτερικό

μέρος του φλοιού και καλύπτεται από κηρώδεις ουσίες. Οι κηρώδεις ουσίες δρουν ως φυσική προστασία της ράγας καθώς παρεμποδίζουν την εξάτμιση χυμού και παράλληλα απομακρύνουν ταχέως την βροχή μειώνοντας έτσι τα υψηλά ποσοστά υγρασίας που μπορούν να προκαλέσουν σήψη της ράγας ή ιδανικό περιβάλλον για παθογόνα και συγκρατούν και τροφοδοτούν με θρεπτικές ουσίες τους ζυμομύκητες που μεταφέρονται μέσω του αέρα στην ράγα (Κοτσερίδης Γ, 2014). Η κηρώδης αυτή ουσία έχει ως κύριο ρόλο τον έλεγχο της επιδερμικής διαπνοής και την παρεμπόδιση της εξάτμισης του νερού των ραγών. Η επιδερμίδα αποτελείται από μία στοιβάδα κυττάρων και είναι το στρώμα του φλοιού στο οποίο περιέχονται αρωματικές και πρόδρομες αρωματικές ενώσεις, χαρακτηριστικές για την κάθε ποικιλία σταφυλιού. Το υπόδερμα αποτελείται από έξι έως δέκα στοιβάδες κυττάρων συνολικά και χωρίζεται σε δυο διακριτές ζώνες. Η εξωτερική ζώνη αποτελείται από δύο έως τρεις στοιβάδες κυττάρων που περιέχουν τις ανθοκυάνες ή τις φλαβόνες, χρωστικές ουσίες στις οποίες οφείλεται το χρώμα των ερυθρών ή των λευκών σταφυλιών αντιστοίχως (Κοτσερίδης Γ., 2014). Ο φλοιός συνολικά αποτελείται κυρίως από νερό (75-80%) ενώ σε αυτόν απαντούν ακόμα ταννίνες (1-2%), μονομερείς κατεχίνες και πολύ μικρή συγκέντρωση σακχάρων. Επιπλέον είναι πλούσιος σε αδιάλυτες πηκτίνες, σε κυτταρίνη, πρωτεΐνες καθώς επίσης και σε οξέα όπως το τρυγικό, το μηλικό και το κιτρικό (Ribereau- Gayon P., *et al.*, 1998).

Η σάρκα (74-87% του βάρους της ράγας) αποτελείται από μεγάλα κύτταρα με πολύ λεπτά και εύθραυστα κυτταρικά τοιχώματα. Υπάρχουν εικοσιπέντε με τριάντα στοιβάδες κυττάρων που χωρίζονται σε ζώνες: το μεσοκάρπιο (εξωτερική και μεσαία ζώνη) και το ενδοκάρπιο (εσωτερική ζώνη). Η ράγα τροφοδοτείται από το φυτό χάρη σε ένα δίκτυο από βιβλαγγειώδεις δέσμες. Το αγγειακό αυτό σύστημα βρίσκεται σε επικοινωνία με τα φύλλα και τις ρίζες μέσω ανάλογων αγγειακών δεσμίδων, με τις οποίες η ράγα προσλαμβάνει ειδικότερα τα σάκχαρα από τα φύλλα και τις ανόργανες ουσίες από τις ρίζες (Κουράκου Σ., 1998). Η χημική σύσταση της σάρκας, η οποία αποτελεί συστατικό του γλεύκους, είναι κατά ένα μεγάλο μέρος ίδια με τη σύστασή του: 65-80% νερό, 10-30% σάκχαρα και 5-6% άλλες ουσίες όπως: οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά, αζωτούχες ουσίες, πηκτινικές ύλες, αρωματικές ουσίες, χρωστικές ουσίες και ταννίνες (Κοτσερίδης Γ., 2014).

Τα γίγαρτα (3-6% του βάρους της ράγας) συνιστούν τα αναπαραγωγικά όργανα της αμπέλου. Η ωοθήκη του άνθους σχηματίζεται από την ένωση δύο καρπόφυλλων, το

κάθε ένα από τα οποία περιέχει δύο σπερματικές βλάστες. Κάθε ράγα πρέπει να περικλείει θεωρητικά τέσσερα γίγαρτα. Συνήθως απαντούν ένα με τρία, ενώ υπάρχουν και ράγες που δεν περικλείουν γίγαρτα. Ο αριθμός των γιγάρτων ανά ράγα επηρεάζεται από την ποικιλία και τις κλιματικές συνθήκες κατά την ανθοφορία. Το γίγαρτο αποτελείται από τη σάρκα, που προστατεύεται εξωτερικά από το κέλυφος ή περισπέρμιο και εμπεριέχει το έμβρυο (Κουράκου Σ., 1998). Τα γίγαρτα αποτελούνται από ένα οξύ μέρος (ράμφος) και ένα ωοειδές τμήμα (σώμα). Το κέλυφος των γιγάρτων αποτελείται από τρία στρώματα: το εξωτερικό κέλυφος που είναι μαλακό και υδατοδιαπερατό, το μεσαίο κέλυφος που είναι σκληρό, πλούσιο σε ταννίνες και αδιαπέρατο στο νερό και το εσωτερικό το οποίο είναι μαλακό και εδώ βρίσκεται η σάρκα του γιγάρτου. Η σάρκα του γιγάρτου είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα. Τα γίγαρτα περιέχουν φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή φαινολικά συστατικά και από αυτά σε μεγάλη συγκέντρωση είναι οι ταννίνες. Τα φαινολικά συστατικά των γιγάρτων αποτελούν το 60% των συνολικών φαινολικών συστατικών της ράγας (Watson B., 2003).



Εικόνα 1 Σχηματική αναπαράσταση μορφολογικής δομής της ράγας (Kennedy, 2008, εικονογράφηση Κουτρομανίδη I., Winetitles). Η εικόνα επεξεργάστηκε ηλεκτρονικά και μεταφράστηκε στα ελληνικά

### 1.3 Φαινολικά συστατικά

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενής μεταβολίτες και είναι παράγωγα του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών, του μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών στα φυτά και του μονοπατιού του σικιμικού οξέος (3,4,5-τριυδροξύ-κυκλοεξ-1-εν-1-καρβοξυλικού οξέος) (Randhir R., Lin Y., & Shetty K., 2004). Αυτές οι ενώσεις είναι

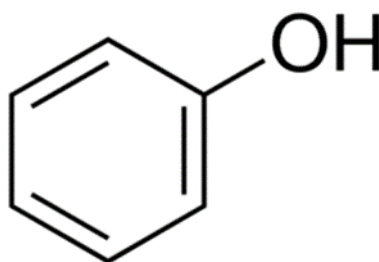
οι πιο ευρέως διαδεδομένες ομάδες φυτοχημικών ουσιών και είναι σημαντικές τόσο για την μορφολογία των φυτών όσο και για την φυσιολογική τους λειτουργία. Συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών παρέχοντας τους προστασία έναντι σε παθογόνα και εχθρούς (Bravo L., 1998) και επιπλέον συμμετέχουν στον καθορισμό του χρώματος και των γενικότερων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των φρούτων και των λαχανικών (Alasalvar C., *et al.*, 2001). Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων, όπως αντιαλλεργιογόνες, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές (Benavente-Garcia, O., *et al.*, 1997).

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν κρίσιμο και βασικό παράγοντα για την επιστήμη της οινολογίας. Είναι υπεύθυνες για όλες τις διαφορές που παρουσιάζονται μεταξύ των λευκών και των ερυθρών οίνων, ειδικά για το χρώμα και την γεύση των ερυθρών οίνων. Τα φαινολικά μόρια των οίνων προέρχονται από διάφορα σημεία της σταφυλής και εκχυλίζονται σε αυτά κατά τη διάρκεια της οινοποίησης. Επιπλέον, ποσότητες φαινολικών ουσιών εκχυλίζονται στους οίνους από το ξύλο των βαρελιών ενώ μικρές ποσότητες μπορούν να σχηματιστούν από τον μεταβολισμό των ζυμών (Jackson D., Lombard P., 1993). Η δομή των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές κατά την παλαίωση σε βαρέλι, σε δεξαμενή ή σε φιάλη ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000). Τα φαινολικά παράγωγα, πέρα από «ρυθμιστές της οινικής ποιότητας» (Κουράκου Σ., 1998), είναι και «ρυθμιστές της υγείας». Χρόνιες μελέτες απέδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές έχουν ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το «Γαλλικό παράδοξο» κατά το οποίο οι Γάλλοι παρά την μεγάλη κατανάλωση λιπαρών τροφών εμφανίζουν σε μικρό ποσοστό καρδιαγγειακά νοσήματα, αποδίδεται στην πολύ συχνή κατανάλωση ερυθρού οίνου, ο οποίος είναι πλούσιος σε φαινολικά συστατικά (Lopez *et al.*, 2003, Kalithraka S., *et al.*, 2005).

Δομικά, οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν ένα αρωματικό δακτύλιο, που φέρει έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου, και κυμαίνονται από απλά φαινολικά μόρια έως μεγάλου βαθμού πολυμερισμού ενώσεις (Bravo L., 1998). Η ταξινόμηση τους περιλαμβάνει δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φλαβονοειδής και τις μη φλαβονοειδής φαινόλες. Στην κατηγορία των φλαβονοειδών φαινολών υπάγονται οι πολυμοριακές φαινόλες με βασικό χημικό τύπο C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, ο οποίος αντιστοιχεί στη φλαβανόνη, και αποτελούνται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο πυριλίου που περιέχει οξυγόνο. Η κατηγορία των μη

φλαβονοειδών φαινολών εμπεριέχει μονομοριακά φαινολικά παράγωγα τα οποία απαντούν στους φυτικούς ιστούς και σε διάφορα φυτικά προϊόντα (Ribereau- Gayon P., *et al.*, 2000).

Από χημικής άποψης, τα φαινολικά συστατικά των οίνων διακρίνονται σε φαινολικά οξέα (100mg/l για ερυθρούς οίνους, 10mg/l για λευκούς), φλαβονοειδείς φαινόλες (10mg/l για ερυθρούς και ελάχιστα για λευκούς), ανθοκυάνες (100-700mg/l για ερυθρούς ενώ δεν απαντούν καθόλου σε λευκούς) και τέλος σε ταννίνες (1-4g/l στους ερυθρούς και 100mg/l σε λευκούς) (Τσακίρης Α., 2014).

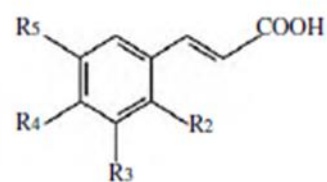
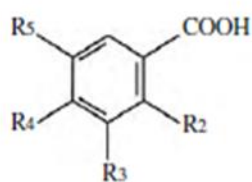


Εικόνα 2 Δομή φαινόλης

### 1.3.1 Μη φλαβονοειδείς ενώσεις

Η παρουσία τους στους οίνους οφείλεται είτε στο σταφύλι, όπου βρίσκονται στους φλοιούς και τη σάρκα, είτε στο ξύλο των βαρελιών, όπου πραγματοποιείται η οξειδωτική παλαίωση των οίνων. Οι ερυθρές ποικιλίες και κατ' επέκταση οι ερυθροί οίνοι περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τις λευκές ποικιλίες και οίνους (Ribereau- Gayon P., *et al.*, 2000).

Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι τα φαινολικά οξέα, και ειδικότερα τα παράγωγα του βενζοϊκού (δομή C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) και κινναμωμικού οξέος (δομή C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Jackson, 2008) και από σιλβένια (Obreque-Slier., *et al.*, 2010), των οποίων ένα ή περισσότερα υδρογόνα των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου τους έχουν αντικατασταθεί με υδροξυλομάδες (-OH) και μεθόξυ (-OCH<sub>3</sub>) ομάδες. Τα φαινολικά οξέα απαντούν στα χυμοτόπια των κυττάρων του φλοιού και της σάρκας των ραγών ως ετεροζίτες ή ως εστέρες. Αποτελούν το κυριότερο φαινολικό συστατικό της σάρκας των ραγών (Κουράκου Σ., 1998, Ribereau- Gayon P., *et al.*, 2000). Τα σταφύλια και ο οίνος περιέχουν επτά βενζοϊκά και πέντε κινναμωμικά οξέα.



(1) Benzoic acids	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	(2) Cinnamic acids
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H	<i>p</i> -Coumaric acid
Protocatechic acid	H	OH	OH	H	Caffeic acid
Vanillic acid	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Ferulic acid
Gallic acid	H	OH	OH	OH	
Syringic acid	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Sinapic acid
Salicylic acid	OH	H	H	H	
Gentisic acid	OH	H	H	OH	

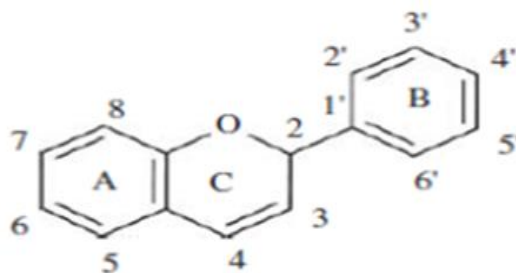
Εικόνα 3 Τα φαινολικά οξέα των σταφυλιών και των οίνων. Πηγή: Handbook of enology, Volume 2, p.142

Τα φαινολικά οξέα είναι άχρωμα στο αλκοολικό διάλυμα αλλά μπορούν να γίνουν έγχρωμα (κίτρινα) λόγω οξειδωσης. Αυτό παρατηρείται κυρίως στο γαλλικό και καφεϊκό οξύ λόγω των δύο υδροξυλίων τους σε όρθο θέση στο μόριο τους. Η οξειδωση τους οδηγεί στο σχηματισμό ουσιών καστανόμαυρου χρώματος με δομή κινόνης που είναι υπεύθυνες για το «καφέτιασμα των οίνων» (Cheynier V., *et al.*, 1990). Από οργανοληπτική σκοπιά, δεν προσδίδουν στους παραγόμενους οίνους χαρακτηριστική γεύση ή άρωμα. Αποτελούν ωστόσο πρόδρομα πτητικών φαινολών που παράγονται από τη δράση ορισμένων μικροοργανισμών (ζυμομύκητες του γένους *Brettanomyces* και κάποια βακτήρια). Τα φαινολικά οξέα παρότι δεν επηρεάζουν άμεσα την οινοποιητική πρακτική εμφανίζουν ενδιαφέρουσα αντιβακτηριδιακή δράση καθώς θεωρούνται παρεμποδιστές της ανάπτυξης βακτηρίων. Αυτό εξηγεί μερικώς και την δυσκολία ορισμένες φορές εκδήλωσης μηλογαλακτικής διεργασίας στους οίνους. Τα βακτήρια έχοντας ατελέστερο ενζυματικό μηχανισμό συγκριτικά με τις ζύμες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία ακόμη και σε μικρές δόσεις αντισηπτικών και αντιβιοτικών (Κουράκου Σ., 1998). Τα άνωθεν φαινολικά οξέα απαντούν είτε εστεροποιημένα, κυρίως με τρυγικό οξύ, είτε σε ελεύθερη μορφή (Ribereau-Gayon P. and Stonestreet, 1965). Κατά την οξειδωτική παλαίωση, οι ερυθροί οίνοι εμπλουτίζονται σε φαινολικά οξέα σε ποσότητες που εξαρτώνται από την προέλευση και το βαθμό καψίματος του ξύλου (Κουράκου Σ., 1998). Όπως προαναφέρθηκε, στις μη φλαβονοειδείς ενώσεις υπάγονται και τα στιλβένια. Τα στιλβένια αποτελούνται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους που συνδέονται με ένα αιθάνιο ή με αλυσίδα αιθυλενίου. Από αυτές τις *trans* ισομερές ενώσεις η σημαντικότερη είναι η ρεσβερατρόλη ή αλλιώς

το 3,5,4'-τρι-υδρόξυ-στιλβένιο. Η ρεσβερατρόλη θεωρείται ότι παράγεται ως άμυνα της αμπέλου σε κρυπτογαμικές ασθένειες (Langcake P., 1981). Εντοπίζεται μόνο στους φλοιούς των ραγών και εκχυλίζεται στους ερυθρούς οίνους κατά την διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρουσία των στεμφύλων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται 1-3 mg/l. Ιατρικές μελέτες αποδίδουν αντικαρκινικό και αντιθρομβωτικό ρόλο στη ρεσβερατρόλη (Ribereau-Gayon P., *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Φλαβονοειδείς ενώσεις

Στις φλαβονοειδείς ενώσεις ανήκουν οι πολυμοριακές φαινόλες που προέρχονται από την ίδια μητρική ένωση που είναι η φλαβόνη και διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες: στα παράγωγα της φλαβόνης (κυρίως φλαβονοειδή) και στα παράγωγα του κατιόντος φλαβυλίου (ανθοκυάνες ή ανθοκυανίνες). Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από ένα βασικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα του τύπου της φλαβόνης. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανονόλες, οι κατεχίνες, οι προκυανιδίνες, οι ανθοκυάνες και οι ταννίνες, που είναι τα πολυμερισμένα τους παράγωγα (Κοτσερίδης Γ., 2014).

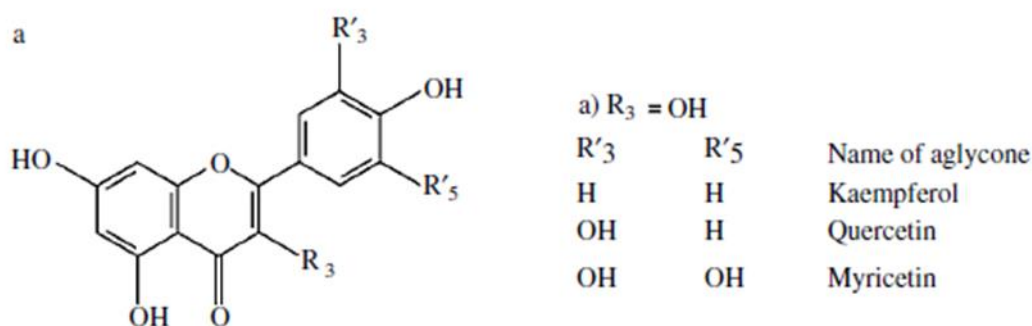


Εικόνα 4: Βασική δομή φλαβονοειδών. Πηγή: [www.researchgate.com](http://www.researchgate.com)

#### 1.3.2.1 Φλαβονόλες

Οι φλαβονόλες ή 3-υδρόξυ-φλαβόνες συναντώνται μόνο στους φλοιούς των ραγών και συγκεκριμένα στο υπόδημα ερυθρών και λευκών σταφυλών σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Είναι χρωστικές κίτρινου χρώματος και στα σταφύλια απαντούν κυρίως σε γλυκοζιδιομένη μορφή. Σχηματίζονται με την προσκόλληση στη θέση -3 του κεντρικού δακτυλίου (βενζοπυρόνη) ενός μορίου μονοσακχαρίτη (κυρίως γλυκόζης) ή ενός μορίου γλυκουρονικού οξέος (Κουράκου Σ., 1998). Στη σταφυλή έχουν βρεθεί

οχτώ μονογλυκοζίτες και τρεις διγλυκοζίτες των φλαβονολών. Στους παραχθέντες οίνους συναντούμε την άγλυκη μορφή τους λόγω υδρόλυσης του γλυκοζιτικού δεσμού κατά την αλκοολική ζύμωση. Παρότι η περιεκτικότητά τους στις ερυθρές και τις λευκές σταφυλές είναι σχεδόν ίδιες, παρατηρείται διαφοροποίηση ως προς την σύσταση τους. Τα παράγωγα της κερκετίνης είναι κυρίαρχα και στις λευκές και στις ερυθρές ποικιλίες αλλά φαίνεται ότι τα παράγωγα της μυρικετίνης και του γλυκοζίτη-3 της ισοραμνετόλης απαντούν μόνο στις ερυθρές. Οι ερυθροί οίνοι λόγω της παρουσίας των στεμφύλων κατά την αλκοολική ζύμωση παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις φλαβονολών (100 mg/l) σε σχέση με τους λευκούς (1-3 mg/l) (Ribereau-Gayon P., *et al.*, 2000).



Εικόνα 5 Χημική δομή φλαβονόλης ( $R_3 = -H$ ) και φλαβονολών ( $R_3 = -OH$ ). Πηγή: *Handbook of enology, volume 2, p.145*

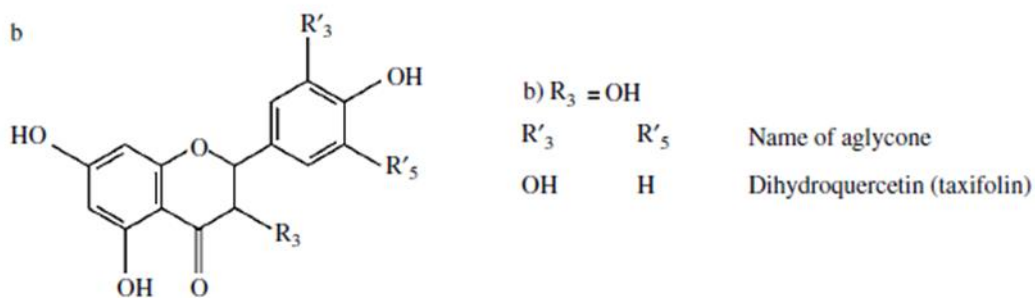
### 1.3.2.2 Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες διαφέρουν από τις φλαβονόλες ως προς τη δομή: στη θέση -3 του μορίου της φλαβονόλης υπάρχει ένα δραστικό  $-OH$ . Οι φλαβανόνες είναι ελάχιστα διαδεδομένες στη φύση και τα παράγωγά τους δεν είναι συστατικά των σταφυλιών. Ανήκουν στα φαινολικά συστατικά του ξύλου της δρυός και, ως εκ τούτου, η παρουσία τους έχει διαπιστωθεί μόνο σε οίνους που παλαίωσαν σε βαρέλια (Κουράκου Σ., 1998). Οι 2 κύριες φλαβανόνες είναι η εσπεριδίνη που βρίσκεται στα πορτοκάλια και η ναρριγετίνη που βρίσκεται στα γκρέιπ φρουτ (Τσακίρης, 1994).

### 1.3.2.3 Φλαβανόλες

Οι ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβανονολών είναι γλυκοζίτες και ταυτοποιήθηκαν σε φλοιούς λευκών ποικιλιών και έχουν πολύ ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Οι φλαβανονόλες απαντούν επίσης και στους βόστρυχες (Κοτσερίδης Γ., 2014).

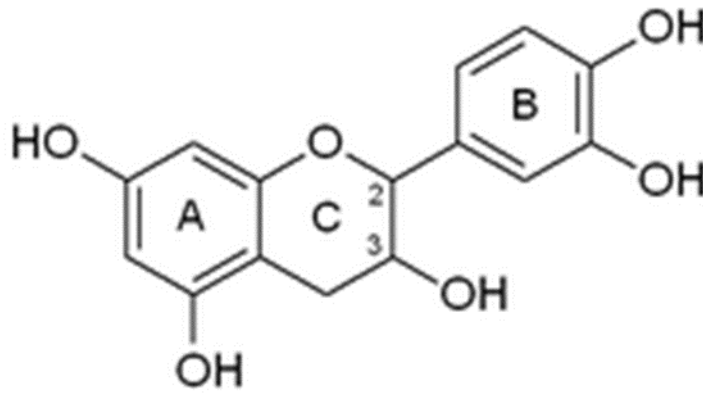




Εικόνα 6 Χημική δομή φλαβανόνης (R<sub>3</sub>=-H) και φλαβανονόλης (R<sub>3</sub>=-OH). Πηγή: *Handbook of enology, volume 2, p.145*

### 1.3.2.4 Κατεχίνες

Οι κατεχίνες (φλαβάν-3-όλη) αποτελούνται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με έναν κορεσμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο οξυγόνου. Η δομή αυτή παρουσιάζει δύο ασύμμετρα άτομα άνθρακα (C<sub>2</sub> και C<sub>3</sub>), με αποτέλεσμα να απαντούν δύο *trans* ισομερή (κατεχίνες) και δύο *cis* ισομερή (επικατεχίνες). Στη φύση συναντώνται και οι τέσσερις μορφές, όμως οι πιο σταθερές αυτών των ισομερών είναι η (+)-κατεχίνη και η (-)-επικατεχίνη (Ribereau-Gayon P., *et al.*, 2000). Οι βόστρυχες και οι φλοιοί, περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά (+)-κατεχίνη ενώ στα γίγαρτα η περιεκτικότητα της (+)-κατεχίνης είναι σχεδόν ίδια με αυτή της (-)-επικατεχίνης. Τα γίγαρτα περιέχουν περίπου το 65% της ολικής συγκέντρωσης των κατεχινών ενώ το ποσοστό σε φλοιούς και βόστρυχες κυμαίνεται στο 20% (Zoecklein B., *et al.*, 1995). Στους λευκούς οίνους η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 10-50 mg/l, ενώ στους ερυθρούς μπορεί να φθάσει 200 mg/l (Zoecklein B., *et al.*, 1995). Εξαιτίας των δύο -OH σε όρθο θέση που βρίσκονται στον πλευρικό βενζοϊκό δακτύλιο του μορίου της, η κατεχίνη είναι ιδιαίτερος ευοξειδωτή. Όταν θερμανθεί σε όξινο περιβάλλον πολυμερίζεται προς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους με αποτέλεσμα αρχικά να προκύπτει ένα κίτρινο διάλυμα, που εν συνεχεία σκουραίνει ανάλογα με το βαθμό πολυμερισμού της παραχθείσας ένωσης και μπορεί να φτάσει έως καστανόμαυρο. Τέτοιας φύσεως οξειδώσεις μπορούν να προκαλέσουν «καφέτιασμα» των οίνων. Συνεπώς, η παρουσία κατεχινών στους λευκούς οίνους καθίσταται ανεπιθύμητη (Cheynier V., *et al.*, 1990, Κουράκου Σ., 1998).

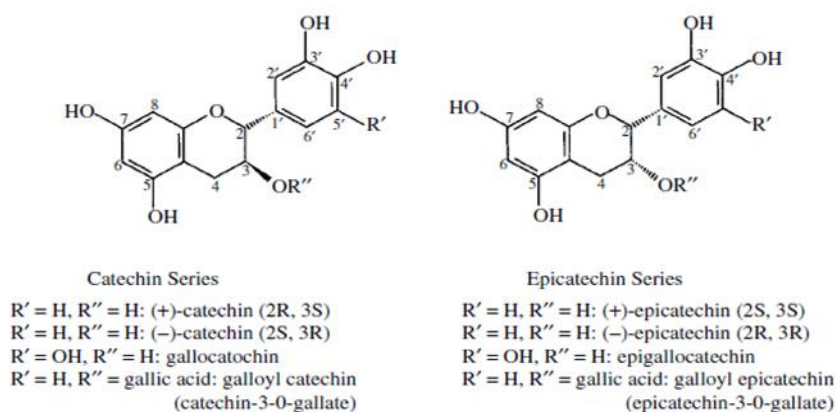


Εικόνα 7: Χημική δομή της κατεχίνης

### 1.3.2.5 Προκυανιδίνες

Οι προκυανιδίνες ή αλλιώς συμπυκνωμένες ταννίνες είναι οι ολιγομερείς και οι πολυμερείς μονάδες της πολύ-υδροξυ φλαβάν-3-όλης που απαντούν στα φυτά και αποτελούν τη δεύτερη πιο άφθονη ομάδα φυσικών φαινολικά μετά την λιγνίνη (Porter L., 1994). Το 1910 ο Laborde επισήμανε την παρουσία άχρωμων ουσιών στις σταφυλές και στους οίνους, οι οποίες μετατρέπονταν σε ανθοκυάνες με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον, για αυτό και τις ονόμασε λευκοκυανιδίνες. Αργότερα, καθορίστηκε η δομή τους και αποδείχθηκε ότι πρόκειται για τις 3,4-φλαβανοδιόλες, οι οποίες είναι αφυδρογονωμένες κατεχίνες (Χαρβαλιά Α.& Μπενά-Τζούρου Ε.,1982). Ωστόσο επικράτησε ο όρος προκυανιδίνη λόγω του σχηματισμού μορίου κυανιδίνης. Οι αφυδρογονώσεις μπορούν να συνεχιστούν με συνενώσεις περισσότερων μορίων με αποτέλεσμα των σχηματισμό περισσότερο συμπυκνωμένων προκυανιδινών. Τα μόρια κατεχίνης έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους ή με μόρια επικατεχίνης προς διμερείς προκυανιδίνες, οι οποίες με τη σειρά τους ενώνονται προς μεγαλύτερα μόρια. Στις ράγες έχουν ανιχνευτεί μέχρι και τετραμερείς προκυανιδίνες. Οι προκυανιδίνες απαντούν στους φλοιούς αλλά κυρίως στα γίγαρτα. Σε έρευνες για την παρουσία κατεχινών και προκυανιδινών σε σταφύλια οχτώ ποικιλιών *Vitis Vinifera* διαπιστώθηκε πως από όλα τα μέρη της σταφυλής, το μεγαλύτερο ποσοστό κατεχινών και προκυανιδινών βρίσκεται στα γίγαρτα με μέσους όρους 65% και 56% αντίστοιχα. Στους βόστρυχες και τους φλοιούς τα ποσοστά είναι περίπου στο 20% ενώ ο χυμός της σταφυλής χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία αυτών των ουσιών. Δεν έχουν γλυκοζιδιομένη μορφή, ενώ έχουν τη δυνατότητα να ενωθούν με πολυσακχαρίτες της

σταφυλής και να εκχυλιστούν με τη μορφή συ-μπλόκων κατά την οινοποίηση (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000). Στους νέους οίνους το μοριακό βάρος τους είναι γύρω στο 600 (σπάνια 900), ενώ κατά την ωρίμανση και παλαίωση του οίνου οι προκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους αλλά και με άλλα μόρια, ώστε να σχηματίζονται πολυμερή μεγαλύτερου μοριακού βάρους (2000-3000), που αντιστοιχούν στις συμπυκνωμένες ταννίνες καθώς οι προκυανιδίνες αποτελούν πρόδρομα μόρια ταννινών (Χαρβαλιά Α., και Μπενά-Τζούρου Ε., 1982). Από τα αποτελέσματα της εν λόγω έρευνας συμπεραίνεται πως ο χυμός των σταφυλών δεν περιέχει ευοξειδωτά υποστρώματα και κατά συνέπεια το γλεύκος τα αποκτά κατά την επεξεργασία του (θλιπτήρια, πιεστήρια). Επιπλέον, προκύπτει ότι, οι ουσίες που διαμορφώνουν την δομή, το «σώμα» και την αντοχή στον χρόνο των ερυθρών οίνων, βρίσκονται στα γίγαρτα (Κουράκου Σ., 1998).



Εικόνα 8 Δομή φλαβάν-3-όλης με υποκαταστάτες Πηγή: *Handbook of Enology*, volume 2, p.149

### 1.3.2.6 Ανθοκυάνες

Οι ανθοκυάνες είναι υπεύθυνες για όλες τις διαφορές χρώματος μεταξύ των ποικιλιών, των σταφυλιών και των οίνων που προκύπτουν. Η ποσότητα και η σύνθεση των ανθοκυανών που υπάρχουν στα κόκκινα σταφύλια ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, τον βαθμό ωρίμανσης, τις κλιματικές και εδαφικές συνθήκες, την περιοχή παραγωγής καθώς και την απόδοση της παραγωγής σε σταφυλές (Mazza G., 1995). Οι ανθοκυάνες βρίσκονται στους φλοιούς των ερυθρών ποικιλιών του *Vitis vinifera*. Σε ελάχιστες ποικιλίες, που ονομάζονται βαφικές, ανθοκυάνες απαντούν και στα πρώτα κύτταρα της σάρκας. Στη σάρκα μπορεί επίσης να παρατηρηθεί η ύπαρξη

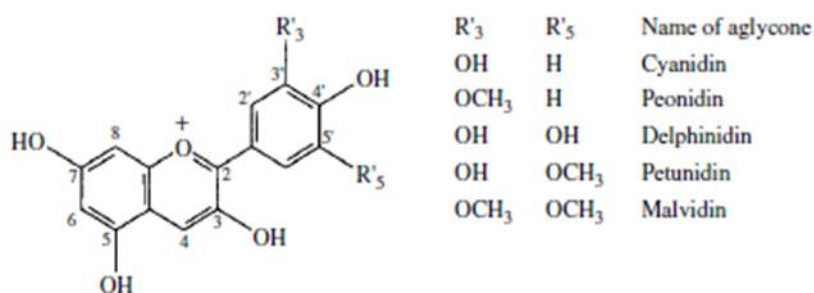
χρωστικών σε στάδια υπερωρίμανσης λόγω του γήρατος των κυττάρων που οδηγεί σε διάχυση των χρωστικών. Ανθοκυάνες σε μεγάλες ποσότητες συναντώνται επίσης στα φύλλα, ειδικά κατά το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου όπου παίρνουν ερυθρό χρωματισμό (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000).

Οι ελεύθερες ανθοκυάνες των σταφυλών συντίθενται μέσω του φλαβονοειδούς μονοπατιού, το οποίο είναι το ίδιο στην ανάντη οδό με αυτό των προανθοκυανιδινών, μέχρι το στάδιο του σχηματισμού ανθοκυανιδινών (Winkel Shirley B., 2001). Η σύνθεση και η αποθήκευση των ανθοκυανών γίνεται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων της πρώτης υποδερμικής στοιβάδας των φλοιών της ράγας των ερυθρών σταφυλών. Οι επόμενες δυο υποδερμικές στοιβάδες μπορεί να περιέχουν μικρές ποσότητες ανθοκυανών και τείνουν στο ελάχιστο έως την έκτη υποδερμική στοιβάδα όπου σπανίως εμφανίζεται χρωματισμός (Mazza G., 1995). Οι κλιματικοί παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των ανθοκυανών. Σημαντικότερος κλιματικός παράγοντας φαίνεται ότι είναι η θερμοκρασία (Mori K., *et al.*, 2007). Σε θερμές περιοχές, η συσσώρευση των ανθοκυανών στους φλοιούς των ερυθρών ποικιλιών αναστέλλεται (Winkler A., *et al.*, 1962). Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση των ανθοκυανών της σταφυλής παρατηρήθηκε ότι καταστέλλονται από τις υψηλές θερμοκρασίες (Mori K., *et al.*, 2005b; Yamane T., *et al.*, 2006). Αποτελέσματα έρευνας υπέδειξαν επίσης, την πιθανότητα οι αυξημένες θερμοκρασίες να οδηγούν σε μείωση της συσσώρευσης των ανθοκυανών όχι μόνο λόγω της καταστολής του μεταβολικού τους μονοπατιού αλλά και λόγω μείωσης της σταθερότητας των μορίων και καταβολισμού τους (Shaked-Sachray L., *et al.*, 2002).

Δομικά, οι ανθοκυάνες είναι ετεροζίτες, των οποίων το άγλυκο μέρος είναι υδροξυλιωμένο και μεθυλιωμένο παράγωγο του φαινυλ-2-βενζοπυριλίου και το σάκχαρο είναι πάντα αλδόζη, κυρίως γλυκόζη. Το κατιόν φλαβυλίου αποτελείται από δύο βενζοϊκούς δακτυλίους συνδεδεμένους με έναν ακόρεστο κατιοντικό ετεροκυκλικό δακτύλιο οξυγόνου. Το άγλυκο μέρος διαφοροποιείται ανάλογα με τις υποκαταστάσεις -OH και -CH<sub>3</sub> στη βασική δομή. Το φλαβύλιο αποτελεί τον πυρήνα της ανθοκυανιδίνης και έχει C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> φλαβονοειδή σκελετό, ο οποίος περιέχει έναν δακτύλιο ετεροκυκλικού βενζοπυρανίου (ως δακτύλιο C), ένα συντηγμένο αρωματικό δακτύλιο (ως δακτύλιο A) και ένα συστατικό φαινυλίου (ως B δακτύλιος). Στη μορφή κατιόντων, οι ανθοκυανιδίνες έχουν δύο διπλούς δεσμούς στον δακτύλιο C και συνεπώς φέρουν θετικό φορτίο (Fei H., *et al.*, 2010). Πέντε μόρια έχουν εντοπιστεί στα σταφύλια και

τους οίνους, με δύο ή τρεις υποκαταστάτες (-OH και -CH<sub>3</sub>). Αυτά τα μόρια είναι πολύ πιο σταθερά ως γλυκοζίτες (ανθοκυάνες) από ότι στην άγλυκη (ανθοκυανιδίνη) μορφή. Μόνο μονογλυκοζίτες ανθοκυανών και ακυλιωμένοι μονογλυκοζίτες ανθοκυανών έχουν ταυτοποιηθεί σε σταφύλια *Vitis vinifera* (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000). Αντίθετα, σε είδη και ποικιλίες των διαφόρων γενών της βορείου Αμερικής, όπως τα είδη *Vitis riparia* και *Vitis rupestris*, οι ανθοκυάνες απαντούν και ως διγλυκοζίτες. Ο γλυκοζιτικός δεσμός σχηματίζεται στον 3<sup>ο</sup> άνθρακα της ανθοκυανιδίνης για την περίπτωση των μονογλυκοζιτών ενώ στην περίπτωση των διγλυκοζιτών σχηματίζεται ένας ακόμη δεσμός μεταξύ του άνθρακα της θέσης 5 της ανθοκυανιδίνης και ενός ακόμη μορίου σακχάρου (Σουφλερός Ε.,2015). Η παρουσία διγλυκοζιτών σε οίνους αποκαλύπτει και την προέλευση τους (ευρωπαϊκές ποικιλίες ή υβρίδια). Από τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου έχει αναφερθεί η παρουσία διγλυκοζιτών μόνο στην ποικιλία Κολλιανίτικο (Σταυρακάκης Μ., 2013).

Οι ανθοκυάνες που απαντούν στις σταφυλές είναι η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η πεονιδίνη, η πετουνιδίνη και η μαλβιδίνη, η οποία είναι συνήθως η κυρίαρχη ανθοκυάνη στα περισσότερα κόκκινα σταφύλια (Holton,T.,1995). Η ποσότητα και η αναλογία της κάθε ανθοκυάνης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ποικιλία και τις αμπελοκομικές τεχνικές. Η αναλογία κ η ποσότητα των ανθοκυανών επηρεάζει τόσο την απόχρωση όσο και την σταθερότητα του χρώματος, τα οποία επηρεάζονται άμεσα από την υδροξυλίωση και την μεθυλίωση του δακτυλίου Β των ανθοκυανιδινών. Οι μπλε αποχρώσεις ενισχύονται με την αύξηση ύπαρξης ελεύθερων υδροξυλομάδων, ενώ η ερυθρότητα εντείνεται με την αύξηση της μεθυλίωσης των υδροξυλομάδων (Jackson R., 2008). Η ύπαρξη υδροξυλίων σε όρθο-θέση καθιστά μια ανθοκυάνη πιο ασταθή συγκριτικά με μια άλλη με μεθύλια ως υποκαταστάτες. Για το λόγο αυτό η δελφινιδίνη και η κυανιδίνη είναι η πιο ασταθής (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000).



Εικόνα 9 Δομή ανθοκυανών που απαντούν σε σταφυλές και οίνους. Πηγή: Handbook of Enology, volume 2,p.145

Η ένταση του χρώματος δεν εξαρτάται μόνο από την αναλογία και την ποσότητα των ανθοκυανών της σταφυλής και του παραγόμενου οίνου. Οι ανθοκυάνες έχουν την ιδιότητα να αποχρωματίζονται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η ύπαρξη ή μη οξυγόνου, το pH, ο θειώδης ανυδρίτης, το ασκορβικό οξύ καθώς και η ύπαρξη άλλων στοιχείων (λόγου χάρη μέταλλα) επηρεάζουν την δράση των ανθοκυανών, μετατρέποντάς έτσι σε άχρωμα μόρια ή σε μεγαλύτερης έντασης και διαφορετικής απόχρωσης, ως μια αντιστρεπτή ή μη αντίδραση (Castañeda-Ovando A., *et al.*, 2009).

### 1.3.2.7 Ταννίνες

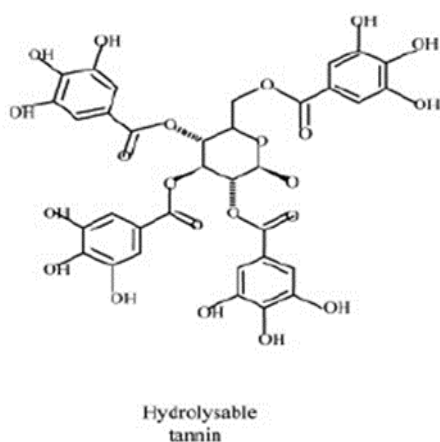
Οι ταννίνες είναι πολυφαινολικοί δευτερογενής μεταβολίτες οι οποίοι απαντούν σε πολλά είδη ανώτερων φυτών (Khanbabae K. and Van Ree T., 2001). Η βιοσύνθεση αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών έχει συνδεθεί άμεσα με παράγοντες όπως η φωτοσυνθετική ικανότητα του φυτού, η υγρασία και η θερμοκρασία (Mooney *et al.*, 1975). Οι ταννίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιολογία της αμπέλου καθώς ενισχύουν την άμυνα του φυτού σε παθογόνα και παράσιτα και συμβάλουν στο χρώμα προστατεύοντας το φυτό από την υπερϊώδη ακτινοβολία (Haslam, E., 1989; Hassanpour S., *et al.*, 2011).

Οι ταννίνες είναι φαινολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους που κυμαίνεται από 600 έως άνω των 3500 Da (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006), και απαντούν στα φύλλα, τον φλοιό, τους καρπούς, τον κορμό και τις ρίζες του φυτού (Hassanpour S., Maheri-Sis N., *et al.*, 2011). Στις ταννίνες συναντώνται σε ποσοστό έως 65%, στους βόστρυχες έως 22%, στους φλοιούς έως 12% ενώ στη σάρκα μόλις σε ποσοστό 1%. Με εξαίρεση κάποιες μεγάλου μοριακού βάρους ταννίνες είναι διαλυτές στο νερό (σε θερμοκρασίες 20-35° C). Τα oligομερή των ταννινών έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες. Στην ιδιότητα δημιουργίας συμπλόκων με τις πρωτεΐνες οφείλεται η μείωση της στυπτικότητας που προκαλούν στο στόμα οι ταννίνες των οίνων (Gawel R., 1997).

Ανάλογα με τη δομή τους, οι ταννίνες μπορούν να διαιρεθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες μακρομορίων, που ονομάζονται υδρολυόμενες ταννίνες και συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυόμενες ταννίνες, αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου, κυρίως γλυκόζη, του οποίου πολλά από τα -OH είναι εστεροποιημένα με διάφορα φαινολικά οξέα, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι το γαλλικό και το

ελλαγικό (Khanbabaee K. and Van Ree T., 2001). Για τον λόγο αυτό, πολλές φορές αναφέρονται ως γαλλοταννίνες ή ελλαγικές ταννίνες. Τα μόρια αυτά είναι υδατοδιαλυτά και καθιζάνουν γρήγορα σε μέσα τα οποία περιέχουν αλκοόλη, όπως οι οίνοι (Moutounet, *et al*, 1989)

Οι υδρολυόμενες ταννίνες δεν απαντούν στη σταφυλή. Η παρουσία τους στο κρασί οφείλεται στην εκχύλιση τους από το ξύλο της δρυός ή στην εξωγενή προσθήκη τους κατά την οινοποίηση, με στόχο κυρίως την καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών (Herderich M. and Smith P., 2005). Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες που έχουν οι πολυφαινολικές ενώσεις (Becker E., *et al*. 2004), η εξωγενής προσθήκη οινολογικών ταννινών ενισχύει την προστασία των οίνων σε οξειδωτικές διεργασίες. Εξίσου σημαντική, είναι η ιδιότητα των υδρολυόμενων οινολογικών ταννινών (όπως και των φυσικών ταννινών της σταφυλής) να συμπλοκοποιούνται με τις πρωτεΐνες του σάλιου, συμβάλλοντας στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των οίνων (Monteleone E., *et al*. 2004, Smith P. and Herderich M., 2004). Οι σημαντικότερες υδρολυόμενες ταννίνες που υπάρχουν στο ξύλο της δρυός, που χρησιμοποιείται για την κατασκευή βαρελιών, είναι η βεσκαλαγίνη και η κασταλαγίνη (Κοτσερίδης Γ., 2017). Η σύνθεση γενικά των ελλαγικών ταννινών εξαρτάται από το βοτανικό είδος της βελανιδιάς. Στα είδη της ευρωπαϊκής βελανιδιάς (*Quercus sessilis*, *Q. pedunculata*) υπάρχουν τέσσερα μονομερή και τέσσερα διμερή ελλαγικών ταννινών, ενώ στο αμερικάνικο είδος (*Q. alba*) δεν ανιχνεύονται διμερή (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000).



Εικόνα 10 Μόριο υδρολυόμενης ταννίνης (Krause D., *et al*, 2005)

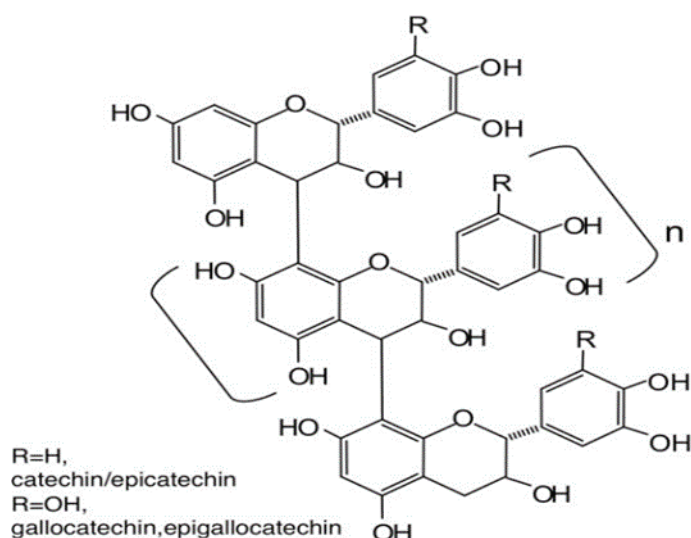
Οι φυσικές ταννίνες της σταφυλής είναι οι συμπυκνωμένες ταννίνες και είναι πιο διαδεδομένες στη φύση συγκριτικά με τις υδρολυόμενες (Κουράκου Σ., 1998). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες είναι μεγάλα μόρια που προέρχονται από τον πολυμερισμό μορίων με δομική μονάδα την φλαβάν-3-όλη, όπως είναι η κατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη (Herderich M. and Smith P., 2005). Οι υποκαταστάτες της βασικής δομής των ταννινών διαφέρει ανάμεσα σε αυτές που απαντούν στο φλοιό και αυτές που απαντούν στα γιγάρτα και τους βόστρυχες (Prieur C., *et al.* 1994, Souquet J., *et al.*, 1996). Οι ταννίνες των γιγάρτων είναι προκυανιδίνες με σχετικά μικρό βαθμό πολυμερισμού στο στάδιο του περκασμού που αυξάνεται κατά την πορεία ωρίμανσης έχουν χαρακτηριστικά έντονη πικρή γεύση (Ribéreau-Gayon P., *et al.*, 2000). Αποτελούνται από υποκαταστάτες κατεχίνης, επικατεχίνης και γαλλικού εστέρα της επικατεχίνης και έχουν μέσο βαθμό πολυμερισμού 12 μονομερή (Prieur C., *et al.* 1994). Οι ταννίνες των φλοιών έχουν πολυπλοκότερη δομή συγκριτικά με τις ταννίνες των γιγάρτων. Σαν υποκαταστάτες ανιχνεύονται οι ίδιοι με αυτούς των ταννινών των γιγάρτων και επιπλέον τα μόρια επιγαλλοκατεχίνης. Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού είναι μεγαλύτερος από αυτόν των ταννινών των γιγάρτων και είναι 30 μονομερή (Souquet J., *et al.*, 1996, Cheynier V., *et al.*, 2005). Οι ταννίνες των βοστρύχων είναι πολυμερισμένες προκυανιδίνες με παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των ταννινών των γιγάρτων.

Τα μονομερή των ταννινών σχηματίζουν αλυσίδες διαφόρων βαθμών πολυμερισμού και έχει παρατηρηθεί ότι όσο μεγαλύτερες είναι αυτές οι αλυσίδες τόσο αυξάνεται η στυπτικότητα τους (Vidal S., *et al.*, 2003). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αναφέρονται και ως προανθοκυανιδίνες, χαρακτηρίζοντας έτσι την ιδιότητα τους να σχηματίζουν κόκκινου χρώματος ενώσεις με οξέα σε όξινο περιβάλλον με θέρμανση. Οι ταννίνες της σταφυλής όμως στη φυσική τους μορφή είναι άχρωμα μόρια. Με την έκθλιψη των σταφυλών, κατά την οινοποίηση, οι ταννίνες ξεκινούν να αντιδρούν με τις ανθοκυάνες σχηματίζοντας έτσι έγχρωμα πολυμερή.

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες εκχυλίζονται στους οίνους κατά τη διάρκεια συμπαραμονής του γλεύκους με τα στέμφυλα. Η περιεκτικότητα του παραγόμενου ερυθρού οίνου σε ταννίνες εξαρτάται τόσο από την ποικιλία από την οποία προέρχεται όσο και από την οινοποιητική τεχνική, και κυμαίνεται από 1-4 g/l. Η περιεκτικότητα ενός λευκού οίνου επηρεάζεται από διαδικασία απολάσπωσης του με τη συγκέντρωση σε μη απολασπώμενα γλεύκη να κυμαίνεται από 100 mg/l έως 300 mg/l (Ribéreau-



Gayon P., *et al.*, 2000, Κοτσερίδης Γ., 2014). Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αποτελούν το «σώμα» του οίνου και αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγώγων (Κουράκου Σ., 1998).



Εικόνα 11 Μόριο συμπυκνωμένων ταννινών Πηγή: Tsuruta Y., *et al.*, 2011

#### 1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την φαινολική σύσταση των ραγών

Η βιοσύνθεση των φαινολικών ενώσεων στη ράγα επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες, αλλά και από την αλληλεπίδραση του γονότυπου των φυτών με περιβαλλοντικούς παράγοντες (Orduna, 2010, Castellarin, *et al.*, 2012). Το σύνολο των περιβαλλοντικών παραγόντων (έδαφος, κλίμα, ποικιλία κ.α.) αναφέρεται με τον όρο *terroir*, από τον γαλλικό όρο «*terre*» που σημαίνει γη (Koundouras *et al.*, 2006). Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση των φαινολικών ενώσεων αναφέρονται παρακάτω:

- Ποικιλία: Κάθε ποικιλία και κάθε κλώνος αυτής χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο φαινολικό δυναμικό (Arozarena *et al.*, 2000). Ως γενικός κανόνας ισχύει ότι στις ερυθρές ποικιλίες η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων είναι υψηλότερη από τις λευκές, αλλά και μεταξύ των ερυθρών υπάρχει διαφοροποίηση ως προς την σύνθεση και την συγκέντρωση των φαινολικών.
- Έδαφος: Ορισμένες ιδιότητες του εδάφους που επηρεάζουν την φαινολική σύσταση είναι η δομή, η σύσταση, η διαθεσιμότητα υγρασίας (Σταυρακάκης, 2013). Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έδειξαν πως σε εδάφη με μειωμένη εδαφική υγρασία,

υπήρξε μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανών και ταννινών στις ράγες (Matthews and Anderson, 1988).

- Κλίμα: Αρχικά η ηλιακή ακτινοβολία θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας. Οι φαινολικές ενώσεις λειτουργούν ως προστατευτικοί παράγοντες των ραγών από την ακτινοβολία του ήλιου. Επιπλέον είναι γνωστό ότι σε ακραίες θερμοκρασίες κάτω των 15 και άνω των 35 °C και σε μεγάλες διαφορές θερμοκρασιών ημέρες-νύχτας, πολλές μεταβολικές διεργασίες σταματούν ή μειώνονται σημαντικά, γι' αυτό παρατηρούνται και αυτές οι διαφορές (Coombe and Dry, 1992, Jackson and Lambard, 1993, Osrecak *et al.*, 2016).

- Άρδευση: Η άμπελος έχει ανάγκη ορισμένης ποσότητας ύδατος σε συγκεκριμένες περιόδους κατά τον ετήσιο κύκλο βλάστησής της. Για παράδειγμα στο στάδιο από την ανθοφορία έως την καρπόδεση οποιαδήποτε έλλειψη νερού και έντονης υδατικής καταπόνησης μπορεί να προκαλέσει μειωμένη καρπόδεση (ανθόρροια), μικρορραγία, καθώς και περιορισμένη διαφοροποίηση ανθικών καταβολών για τον επόμενο ετήσιο κύκλο (Κουνδουράς, 2017). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει πως μετά τον περκασμό οι συνθήκες μειούμενης υδατικής παροχής έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας των ανθοκυανών στις ράγες. Αυτό συμβαίνει διότι λόγω της έλλειψης νερού το μέγεθος της ράγας μειώνεται κι έτσι αλλάζει η αναλογία βάρους φλοιού της ράγας προς ολικό βάρος ράγας. Έτσι η περιεκτικότητα ανθοκυανών και ταννινών στις ράγες αυξάνεται (Downey *et al.*, 2006). Από την άλλη μεριά, η υπερβολική άρδευση έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία πλούσιου φυλλώματος και επομένως την σκίαση των σταφυλιών, αναστέλλοντας έτσι τη διαδικασία της σύνθεσης των ανθοκυανών (Esteban *et al.*, 2001, Ojeda *et al.*, 2002). Τέλος, υπερβολική άρδευση πριν τον τρυγητό έχει ως αποτέλεσμα των αραίωση των ταννινών και ανθοκυανών της ράγας (Conde *et al.*, 2007).

- Λίπανση: Η λίπανση με άζωτο και κάλιο σε μεγάλες συγκεντρώσεις έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της περιεκτικότητας των ανθοκυανών στις ράγες, λόγω της αύξησης του φυλλώματος και της ζωνρότητας του φυτού (Jackson *et al.*, 1993, Keller and Hrazdina, 2008, Delgado *et al.*, 2004). Επίσης, ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει πως οι μικρές ποσότητες αζώτου στο έδαφος έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ρεσβερατρόλης στα σταφύλια (Bavaresco *et al.*, 2001, Bavaresco *et al.*, 2007).

## 1.5 Κλωνική επιλογή

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1930 και του 1940, κατέστη σαφές ότι οι ασθένειες των ιών μειώνουν την παραγωγικότητα και την ποιότητα ορισμένων αμπελώνων. Επιπλέον, πολλές ποικιλίες αμπέλου δεν είχαν ταυτοποιηθεί σωστά. Το 1952, ο Harold Olmo σχημάτισε τον Οργανισμό Πιστοποίησης Αμπέλου στην Καλιφόρνια (California Grape Certification Association) που ήταν υπεύθυνος για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και τη διανομή φυτών με ανθεκτικότητα σε ιώσεις, όπως επίσης και των σωστών αναγνωρισμένων αποθεμάτων σε φυτά αμπέλου. Το 1958, ο οργανισμός αυτός ξεκίνησε να συνεργάζεται με το πανεπιστήμιο Davis και η συνεργασία αυτή οδήγησε στη δημιουργία του προγράμματος Foundation Plant Materials Service, που είχε ως στόχο την ανίχνευση και τη μελέτη φυτικών ιών και την εξάλειψή τους. Σήμερα το πρόγραμμα αυτό είναι γνωστό ως Foundation Plant Services (FPS). Το FPS είναι ένα ίδρυμα ποικιλιών αμπέλου και αποτελεί την πηγή ποικιλιών σταφυλιών στο Πρόγραμμα Εγγραφής και Πιστοποίησης Αμπέλου της Καλιφόρνια. Τα αμπέλια στο FPS είναι «πιστοποιημένα πρέμνα» από το Υπουργείο Τροφίμων και Γεωργίας της Καλιφόρνια και πρέπει να διατηρούν ορισμένα πρότυπα ως προς τη φυτοϋγειονομική τους κατάσταση, όπως αυτά ορίζονται από τις κρατικές ρυθμίσεις του Υπουργείου. Το πιστοποιημένο φυτικό υλικό από το FPS πωλείται σε φυτώρια αμπέλου με στόχο τον πολλαπλασιασμό του και τη δημιουργία πιστοποιημένου αποθέματος πρέμνων με τελικό αποδέκτη τους αμπελοκαλλιεργητές. Αυτή η πιστοποίηση εξασφαλίζει στους καλλιεργητές ότι τα πρέμνα έχουν ολοκληρώσει επιτυχώς εκτεταμένες δοκιμές σε ιούς. Το FPS είναι επίσης εξουσιοδοτημένο να εισάγει νέες ποικιλίες σταφυλιών από όλο τον κόσμο, αυξάνοντας έτσι τις διαθέσιμες επιλογές των αμπελουργών. Εκτός από την εισαγωγή νέων ποικιλιών, το FPS εργάζεται επίσης και για τη διατήρηση ποικιλιών που καλλιεργούνται στην περιοχή της Καλιφόρνιας.

Σήμερα, σε όλο το γνωστό αμπελουργικό και οινολογικό κόσμο, η ανάγκη για βαθύτερη γνώση των χαρακτηριστικών των ποικιλιών, καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων επιλογής και πολλαπλασιασμού συγκεκριμένων πρέμνων για κάθε ποικιλία, με στόχο τη βελτίωση του τελικού προϊόντος, κρίνεται επιτακτική. Η κλωνική επιλογή στην άμπελο, εκμεταλλεύεται και προσθέτει αξία στην υπάρχουσα ενδο-ποικιλιακή παραλλακτικότητα. Αυτή η γενετική παραλλακτικότητα προέρχεται κυρίως από

φυσικές μεταλλάξεις οι οποίες σταθεροποιούνται με τον αγνή πολλαπλασιασμό. Η πιθανότητα ύπαρξης ενδο-ποικιλιακής παραλλακτικότητας αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας των αμπελώνων. Επίσης αυξάνεται για τις ποικιλίες που είναι γνωστό ότι καλλιεργούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι οποίες είναι ευρέως διαδεδομένες και οι οποίες καταλαμβάνουν σημαντικό μέρος της έκτασης που καλλιεργείται η άμπελος. Η κλωνική επιλογή προσπαθεί να εντοπίσει μεμονωμένα πρέμνα με θετικά τροποποιημένα χαρακτηριστικά, όπως αυτά ορίζονται από τους στόχους της διαδικασίας επιλογής εντός της συγκεκριμένης ποικιλίας. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορεί να ισχύουν για διαφορετικές κατηγορίες φαινολογικών χαρακτηριστικών (π.χ. χρόνος ωρίμανσης), παραμέτρους απόδοσης και ποιότητας (π.χ. προφίλ αρώματος) ή ευαισθησία και αντοχή σε επιβλαβείς οργανισμούς. Υπάρχουν δύο κρίσιμες παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την ανάπτυξη μιας ανώτερης συλλογής ποικιλιών αμπέλου. Η πρώτη αφορά τη φυτοϋγειονομική κατάσταση των πρέμνων. Χρησιμοποιώντας πιστοποιημένο γενετικό υλικό, οι καλλιεργητές μπορούν να μειώσουν την αβεβαιότητα σχετικά με την απόδοση των πρέμνων. Δεύτερον, καθώς συγκρίνονται οι διαφορετικές επιλογές της ίδιας ποικιλίας, γίνονται εμφανείς οι διαφορές απόδοσης. Αυτές οι διαφορές προκαλούνται από μεταλλάξεις σε γονίδια που ελέγχουν χαρακτήρες όπως το μέγεθος των φύλλων, το χρώμα των καρπών, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες και την ταχύτητα ωρίμανσης. Με την πάροδο του χρόνου, οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται. Οι επιλογές που διαφέρουν με αυτούς τους τρόπους και έχουν αξιολογηθεί, είναι γνωστές ως «κλώνοι» μιας ποικιλίας. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η φύτευση ανώτερων κλώνων μπορεί να βελτιώσει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των σταφυλών και κατ' επέκταση των παραχθέντων οίνων μίας ποικιλίας.

Σήμερα, με την συνεχή αύξηση διαθεσιμότητας μητρικού φυτικού υλικού, οι αμπελοκαλλιεργητές καλούνται κατά τη φύτευση ενός νέου αμπελώνα να εξετάζουν ενδελεχώς όχι μόνο την καταλληλότητα της ποικιλίας που επιθυμούν να καλλιεργήσουν (σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά και τις συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή καλλιέργειας) αλλά και την επιλογή κατάλληλου κλώνου.

Οι νέοι κλώνοι συνεχίζουν να προέρχονται από επίσημα προγράμματα επιλογής κλώνων και δημόσια ερευνητικά προγράμματα σε όλο τον κόσμο. Μερικά από τα προγράμματα που έχουν συμβάλει σημαντικά στην κλωνική ποικιλομορφία της

Καλιφόρνιας είναι το ENTAV (Etablissement National Technique pour Amélioration de la Viticulture), το Geisenheim (Ινστιτούτο Ερευνών Geisenheim) και το Rauscedo (Vivai Cooperativi Rauscedo). Μέσω των συγκεκριμένων προγραμμάτων, καθίσταται δυνατή η συνεχής προσθήκη νέων κλώνων, για ορισμένες από τις σημαντικότερες καλλιεργήσιμες ποικιλίες αμπέλου, στον εθνικό κατάλογο του FPS. Ο ίδιος κλώνος μπορεί να εισαχθεί περισσότερες από μία φορές στον FPS. Κάθε εισαγωγή λαμβάνει ένα μοναδικό αριθμό επιλογής για να διατηρήσει την ταυτότητά της. Επιπλέον, οι υποκλώνοι που έχουν παραχθεί με θερμική επεξεργασία λαμβάνουν επίσης μοναδικούς αριθμούς.

Οι αποφάσεις σχετικά με τους κλώνους έχουν γίνει αναπόσπαστο μέρος της διαδικασίας σχεδιασμού και εγκατάστασης ενός νέου αμπελώνα. Σε οινοπαραγωγικές περιοχές, οι αμπελουργοί επιθυμούν να λαμβάνουν εκτεταμένη γνώση σχετικά με τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του κάθε κλώνου ως προς τη βελτίωση των παραχθέντων οίνων και ως προς τη συμβολή στη δημιουργία οίνων συγκεκριμένου στυλ και προφίλ. Μαζί με αυτό το αυξημένο ενδιαφέρον για τις δυνατότητες των κλώνων, πολλά σημαντικά σημεία πρέπει να ληφθούν υπόψη: Η επιλογή του κατάλληλου κλώνου είναι μόνο μία από τις πολλές σημαντικές αποφάσεις κατά την εγκατάσταση ενός αμπελώνα. Η επιλογή της ποικιλίας, το κλίμα της περιοχής, ο τύπος του εδάφους, ο σχεδιασμός του αμπελώνα και οι ετήσιες καλλιεργητικές πρακτικές, θα επηρεάσουν την τελική ποιότητα του οίνου, σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από την κλωνική επιλογή. Δεν υπάρχει «τέλειος» κλώνος που δύναται να ξεπεράσει την ακαταλληλότητα μιας περιοχής ή τις εσφαλμένες αμπελουργικές τεχνικές. Η καταλληλότητα ενός κλώνου για ένα συγκεκριμένο αμπελώνα εξαρτάται από τα προσδοκώμενα και επιθυμητά χαρακτηριστικά του οίνου, καθώς και από τις συνθήκες της περιοχής και του αμπελώνα που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Οι κλώνοι υψηλής απόδοσης είναι κατάλληλοι για κρασιά χαμηλού κόστους, όπως και οι κλώνοι χαμηλής απόδοσης για κρασιά υψηλής αξίας. Όταν η τιμή λιανικής φιάλης για μια ποικιλία μπορεί να ποικίλει περισσότερο από 20 φορές, υπάρχει χώρος για περισσότερους από έναν κλώνους. Επομένως, ο όρος «καλύτερο» έχει αξία και πρέπει να ορίζεται προσεκτικά με βάση τους στόχους τόσο του αμπελουργού όσο και του οινοπαραγωγού. Οι κλώνοι από περιοχές γνωστές για εκλεκτό κρασί, ιδιαίτερα από τη Βουργουνδία και το Μπορντό, είναι ιδιαίτερα περιζήτητοι. Ωστόσο, τα κριτήρια επιλογής πρέπει να κατανοηθούν ρητά για να εξακριβωθεί εάν οι κλώνοι που

επιλέγονται είναι οι καταλληλότεροι για το συγκεκριμένο τόπο φύτευσης. Έτσι, «καλοί» κλώνοι σε αυτές τις περιοχές είναι εκείνοι που αποδίδουν καλά υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές και οικονομικές συνθήκες. Πριν, λοιπόν, πραγματοποιηθεί μια σημαντική επένδυση σε κλώνους που έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ποιότητας και απόδοσης σε άλλη χώρα από αυτή που επιθυμεί ο αμπελουργός να τους εγκαταστήσει, πρέπει να πραγματοποιηθεί ενδελεχής έλεγχος ως προς τη συμβατότητα των επιλεγμένων κλώνων με την περιοχή φύτευσης.

Η συνεχής κλωνική αξιολόγηση σημαντικών ποικιλιών όπως το Cabernet Sauvignon και το Chardonnay στην Καλιφόρνια υποστηρίζεται οικονομικά από οργανισμούς χρηματοδότησης καλλιεργητών και αμπελουργών. Για τις κύριες ποικιλίες, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir, απαιτούνται πολλές δοκιμές για να κατανοήσουμε πώς θα αποδώσουν οι κλώνοι σε διαφορετικές περιοχές. Τέλος, η κλωνική αξιολόγηση περιλαμβάνει τρία διαδοχικά βήματα: την αμπελουργική ανάλυση, τη χημική ανάλυση του οίνου και την οργανοληπτική του αξιολόγηση. Κάθε βήμα βασίζεται στο προηγούμενο, αλλά με αυξανόμενες ανάγκες σε πόρους

## **1.6 Αμπελογραφία**

### **1.6.1 Ασύρτικο**

Το Ασύρτικο είναι μια γηγενής, λευκή ποικιλία της Σαντορίνης και καλύπτει το 80% του συνολικού αμπελώνα του νησιού. Η ποικιλία αυτή συνιστάται να καλλιεργείται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία στα αμπελουργικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου, της Στερεάς Ελλάδας, της Θεσσαλίας, της Μακεδονίας, της Θράκης, των Κυκλάδων, των Δωδεκανήσων, καθώς και στους νομούς Λέσβο και Χίου, αλλά και στο νησί της Ικαρίας (Νικολάου, 2012). Η σταφυλή είναι μέτρια έως μεγάλη, κυλινδρική ή κωνική, απλή, πυκνή, με ράγες ίσου μεγέθους. Η ράγα είναι μέτρια έως μεγάλη και σφαιρική έως ελλειπσοειδής. Ο φλοιός είναι κίτρινος, έχει χρυσές αποχρώσεις, μέτριο πάχος, είναι διαφανής και καλύπτεται από λεπτό στρώμα κέρινης ανθηρότητας. Η σάρκα είναι μαλακή, μετρίως χυμώδης και με χαρακτηριστική υπόξινη γεύση (Σταύρακας, 2011).

Η ποικιλία Ασύρτικο μπορεί να συνοινοποιηθεί με τις ποικιλίες Αθήρι, Αηδάνι, Ροδίτη, Μονεμβασιά και Κυδωνίτσα για να δώσει οίνους Ονομασίας Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας (ΟΠΑΠ) και οίνους Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ). Τέλος το Ασύρτικο συμμετέχει στους γλυκούς οίνους Vinsanto, οι οποίοι προέρχονται από την οινοποίηση λιαστών σταφυλιών (Σταύρακας, 2011).

### **1.6.2 Μοσχοφίλερο**

Το Μοσχοφίλερο είναι η μόνη γηγενής ερυθρωπή αρωματική ποικιλία που καλλιεργείται στην Ελλάδα. Καλλιεργείται κυρίως στο νομό Αρκαδίας στην περιοχή της Μαντινείας. Η ποικιλία αυτή συνιστάται να καλλιεργείται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία στο αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου και επιτρέπεται στη νομαρχιακή αυτοδιοίκηση της Εύβοιας. Είναι μια αξιόλογη ποικιλία, αφού είναι αρωματική, φαινόμενο σπάνιο για ντόπια ποικιλία παρασκευής λευκών οίνων στην Ελλάδα. Η συνολική καλλιεργούμενη έκταση είναι 11.150 στρέμματα στη χώρα μας (Σταύρακας, 2011). Η σταφυλή είναι συνήθως μεγάλη, κυλινδρική έως κυλινδροκωνική και κανονικής πυκνότητας. Η ράγα είναι μέτρια και σφαιρική. Ο φλοιός είναι παχύς, ερυθροιώδης, καλυμμένος με πυκνή, λευκωπή κέρινη ανθηρότητα.

Το γλεύκος έχει ικανοποιητική περιεκτικότητα σε σάκχαρα που κυμαίνεται περίπου στα 210 g/L, ολική οξύτητα περίπου 8 g τρυγικού οξέος/L, ενώ το pH έχει τιμές γύρω στο 3,3 (Νικολάου, 2012).

Η ποικιλία Μοσχοφίλερο σε συνδυασμό με τις ποικιλίες ασπρούδες δίνει λευκούς και ξηρούς οίνους ΟΠΑΠ «Μαντινεία». Επίσης, από την ποικιλία Μοσχοφίλερο παράγονται οι Τοπικοί Οίνοι «Αρκαδία» και με συνοινοποιήσεις με άλλες ποικιλίες παράγονται οι Τοπικοί Οίνοι «Πελοποννησιακό», «Αηλαντίου Πεδίου», «Ριτσώνας», «Καρύστου» και «Ευβοίας». Τέλος, παράγονται ερυθρωποί και αφρώδεις οίνοι χωρίς γεωγραφική ένδειξη (Σταύρακας, 2011).

### **1.6.3 Ροδίτης**

Ο Ροδίτης είναι μια ευρέως γνωστή καλλιεργούμενη ποικιλία στον ελλαδικό χώρο και καλλιεργείται στα περισσότερα αμπελουργικά διαμερίσματα της Ελλάδας καταλαμβάνοντας περίπου 96.000 στρέμματα. Η ποικιλία αυτή συνιστάται να καλλιεργείται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία στα αμπελουργικά διαμερίσματα της Πελοποννήσου, της Στερεάς Ελλάδας, της Θεσσαλίας, της Ηπείρου, της

Μακεδονίας, της Θράκης και των νησιών του Ιονίου πελάγους και επιτρέπεται στο αμπελουργικό διαμέρισμα των Κυκλάδων (Σταύρακας, 2011).

Ο Ροδίτης δίνει εκλεκτής ποιότητας λευκούς ή ερυθρωπούς ξηρούς οίνους και ρετσίνες. Επίσης δίνει οίνους με Ονομασία Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας (ΟΠΑΠ) «Πάτρα» και σε συνοινοποίηση τους «Αγχιάλος» (Ροδίτης-Σαββατιανό 1:1) και «Πλαγιές Μελίτων» (Αθήρι 50%-Ροδίτης 35%-Ασύρτικο 15%). Τέλος συμμετέχει στην παραγωγή 30 λευκών και ερυθρωπών ξηρών Τοπικών Οίνων (Σταύρακας, 2011).

#### **1.6.4 Αγιωργίτικο**

Το Αγιωργίτικο είναι μια αξιόλογη ερυθρή ποικιλία που καλλιεργείται στη Νεμέα και καλύπτει το 80% του συνολικού αμπελώνα της περιοχής. Το μεγαλύτερο μέρος των ερυθρών οίνων στην Ελλάδα προέρχονται από σταφύλια αυτής της ποικιλίας. Η ποικιλία αυτή συνιστάται να καλλιεργείται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία στο αμπελουργικό διαμέρισμα της Πελοποννήσου και στις νομαρχιακές αυτοδιοικήσεις των Αθηνών, Ανατολικής Αττικής, Δυτικής Αττικής, Πειραιώς, Αιτωλοακαρνανίας, Βοιωτίας, Εύβοιας και επιτρέπεται στις νομαρχιακές αυτοδιοικήσεις της Δράμας, Πέλλας, Πιερίας και Φλώρινας (Σταύρακας, 2011). Η σταφυλή είναι μέτρια, κωνική ή κυλινδροκωνική, συχνά διπλή και πυκνή έως πολύ πυκνή. Η ράγα είναι μετρίου έως μεγάλου μεγέθους, κυλινδοκωνική και πυκνή. Η ράγα είναι μικρή έως μεσαίου μεγέθους με παχύ φλοιό και μαλακή και χυμώδη σάρκα (Σταύρακας, 2011).

Η ποικιλία αυτή δίνει οίνους ερυθρούς ξηρούς, ημίξηρους, ημίγλυκους, γλυκούς, με Ονομασία Προελεύσεως Ανωτέρας Ποιότητας (ΟΠΑΠ) «Νεμέα», καθώς και αξιόλογους Τοπικούς Οίνους (Σταύρακας, 2011).

#### **1.6.5 Ξινόμαυρο**

Το Ξινόμαυρο είναι μια ερυθρή ποικιλία της κεντρικής και δυτικής Μακεδονίας. Η ποικιλία αυτή συνιστάται να καλλιεργείται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία στις νομαρχιακές αυτοδιοικήσεις της Θεσσαλονίκης, Χαλκιδικής, Κιλκίς, Ημαθίας, Πέλλας, Φλώρινας, Καστοριάς, Κοζάνης, Γρεβενών, Λάρισας και Τρικάλων, ενώ η καλλιέργεια αυτής επιτρέπεται στις νομαρχιακές αυτοδιοικήσεις των Ιωαννίνων, Μαγνησίας και Λάρισας (Σταύρακας, 2011). Η σταφυλή του Ξινόμαυρου είναι μετρίου μεγέθους, κυλινδροκωνική, ορισμένες φορές πτερυγωτή και μέσης πυκνότητας προς



πυκνής. Η ράγα της ποικιλίας είναι μεσαίου μεγέθους προς μικρή και σφαιρική. Ο φλοιός είναι παχύς, κυανομελανός, με άφθονη ανθηρότητα. Επίσης, είναι πλούσιος σε χρωστικές και τανίνες. Η σάρκα είναι μαλακή, χυμώδης με πολλά οξέα (Σταύρακας, 2011).

Οι οίνοι της ποικιλίας αυτή έχουν υψηλή οξύτητα, καλό ερυθρό χρώμα, πλούσιο σώμα και ικανότητα παλαίωσης. Το Ξινόμαυρο δίνει ερυθρούς ξηρούς οίνους ΟΠΑΠ «Νάουσα» και «Αμύνταιο», με συνοינוποίηση με την ποικιλία Νεγκόσκα δίνει οίνους ΟΠΑΠ «Γουμένισσα», ενώ με την συνοינוποίηση με τις ποικιλίες Σταυρωτό και Κρασάτο δίνει οίνους ΟΠΑΠ «Ραψάνη». Επιπλέον, δίνει ημίξηρους και ημίγλυκους οίνους ΟΠΑΠ «Νάουσα» και «Αμύνταιο», αφρώδεις και Τοπικούς Οίνους με την συνοינוποίηση άλλων ποικιλιών.

## **Κεφάλαιο 2: Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1 Σχεδιασμός και στόχος του πειράματος**

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη ποιοτικών χαρακτηριστικών σταφυλών και οίνων που παράχθηκαν από κλώνους πέντε ελληνικών ποικιλιών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τρεις λευκές και δύο ερυθρές ποικιλίες. Στην Ελλάδα πρώτη φορά πραγματοποιείται συγκροτημένη μελέτη σταφυλιών και οίνων των κλώνων κύριων ελληνικών ποικιλιών. Οι ποικιλίες και οι κλώνοι αυτών, καθώς και οι κωδικοί των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη, εμφανίζονται στον κάτωθι πίνακα (Πίνακας 1). Οι κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες της συγκεκριμένης μελέτης καλλιεργήθηκαν στην περιοχή της Νεμέας και τα σταφύλια παραχωρήθηκαν στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών από τα Φυτόρια Αμπέλου Μπακασιέτας (VNB).

Πίνακας 1: Ποικιλίες – Κλώνοι – Κωδικοί Δειγμάτων

Ποικιλία	Κλώνος	Κωδικός δείγματος
Ασύρτικο	E11	AS11
	16	AS16
Μοσχοφίλερο	E26	M26
	E27	M27
Ροδίτης	25- E16	R16
	02- E1- E21	R21
Αγιωργίτικο	03- E40	AG40
	41- E47	AG47
Ξινόμαυρο	19	J19
	E2- E30	J30

## 2.2 Πρωτόκολλο οινοποίησης

Όλες οι οινοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οινολογίας και Αλκοολούχων Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τον τρύγο του 2019. Ακολουθήθηκε κοινό πρωτόκολλο οινοποίησης για τις τρεις λευκές και ομοίως, για τις δύο ερυθρές ποικιλίες. Κατά την πορεία της αλκοολικής ζύμωσης, γινόταν καθημερινώς έλεγχος θερμοκρασίας και σακχαροπεριεκτικότητας με διαθλασίμετρο. Στους ερυθρούς εν ζυμώσει οίνους, πραγματοποιούταν σπάσιμο καπέλου (pigage) 2 φορές την ημέρα. Κατά την παραλαβή όλων των σταφυλών, υπολογίστηκε από αντιπροσωπευτικό δείγμα, το βάρος και ο όγκος εκατό ραγών, και επιπλέον αποθηκεύτηκε δείγμα ραγών σε κατάψυξη (-80° C) για τη διεξαγωγή αναλύσεων.

Στις λευκές ποικιλίες, έγινε παραλαβή των σταφυλιών, ακολούθησε αποβοστρύχωση και σπάσιμο των σταφυλιών και στη συνέχεια με χρήση υδροπρέσσας παραλαβή του γλεύκους. Στα λευκά γλεύκη, έγινε προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (4g/hl Metabisulfite), ασκορβικού οξέος (10g/hl), οινολογικών ταννινών (5g/hl) και διαυγαστικών ενζύμων (4g/hl). Στη συνέχεια, τα γλεύκη παρέμειναν σε ψυχόμενη δεξαμενή για προζυμωτική απολάσπωση για 12 ώρες. Μετά την απολάσπωση, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του γλεύκους με *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* (20g/hl, SafEno™ GV S107, Fermentis) και δύο ώρες μετά την προσθήκη του εμβολίου έγινε οργανική θρέψη (20g/hl Springferm, Fermentis) και προσθήκη αυτολυμένων κυττάρων

ζυμομυκήτων (10g/hl Springcell, 20g/hl Springarom, Fermentis). Στο μέσο της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε δεύτερη θρέψη, οργανική και ανόργανη (20g/hl σε αναλογία 1:1 Springferm με DAP). Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, οι οίνοι απολασπώθηκαν και έγινε προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (10g/hl, Metabisulfite). Οι οίνοι παρέμειναν σε ψυγειοθάλαμο για τρυγική σταθεροποίηση και εν συνεχεία ελέγχθηκαν για πρωτεϊνική αστάθεια. Όλοι οι λευκοί οίνοι σταθεροποιήθηκαν πρωτεϊνικά με προσθήκη μπετονίτη, σύμφωνα με την ενδεδειγμένη συγκέντρωση με βάσει τα τεστ που πραγματοποιήθηκαν (Bentochek και θέρμανση στους 80° C για έξι ώρες) σε συνδυασμό με οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων. Τέλος, οι οίνοι φιλτραρίστηκαν, έγινε εκ νέου προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (σύμφωνα με την αντίστοιχη μέτρηση ελεύθερου θειώδους) και εμφιαλώθηκαν.

Όσον αφορά τις ερυθρές ποικιλίες, μετά την παραλαβή των σταφυλιών ακολούθησε αποβοστρύχωση και προσθήκη θειώδους ανυδρίτη (7g/ hl, Metabisulfite), οινολογικών ταννινών (20g/hl) και εκχυλιστικών ενζύμων (4g/hl). Μετά από έξι ώρες, τα γλεύκη εμβολιάστηκαν με *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces bayanus* (20g/hl, SafCeno™ HD S135, Fermentis) και δύο ώρες μετά τον εμβολιασμό ακολούθησε οργανική θρέψη (20g/hl, Springferm, Fermentis). Στο μέσο της αλκοολικής ζύμωσης, πραγματοποιήθηκε δεύτερη θρέψη, οργανική και ανόργανη (20g/hl σε αναλογία 1:1 Springferm με DAP). Στο τέλος της αλκοολικής ζύμωσης, έγινε διαχωρισμός στεμφύλων και εμβολιασμός των παραχθέντων οίνων με γαλακτικά βακτήρια *Oenococcus oeni* (Viniflora CH-11, CHR HANSEN). Η πορεία της μηλογαλακτικής ζύμωσης ελεγχόταν ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και το τέλος αυτής πιστοποιήθηκε με ενζυμική ανάλυση. Στη συνέχεια, οι οίνοι απολασπώθηκαν και προστέθηκε σε αυτούς θειώδης ανυδρίτης (10g/hl), φιλτραρίστηκαν και εμφιαλώθηκαν.

Στους παραχθέντες οίνους και στα δείγματα ραγών πραγματοποιήθηκαν όλες οι αναλύσεις που περιγράφονται στη συνέχεια του κεφαλαίου.

## **2.3 Αναλύσεις ραγών**

### **2.3.1 Προσδιορισμός αφομοιώσιμου αζώτου**

Το άζωτο είναι η κρίσιμη θρεπτική ουσία σταφυλιού για την ανάπτυξη των ζυμών και τη δραστηριότητα ζύμωσης και επηρεάζει το ρυθμό και την ολοκλήρωση της αλκοολικής ζύμωσης, των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και του στίλ του κρασιού. Το

αφομοιώσιμο άζωτο των σταφυλιών (YAN) προσδιορίζεται με τον ανεξάρτητο προσδιορισμό του αμμωνιακού και οργανικού (α- αμινοξέων) αζώτου. Στη συνέχεια αυτά εκφράζονται ως προς ισοδύναμα αζώτου και προστίθενται:

$$YAN = \text{mg αμμωνιακού N/L} + \text{mg N βασικών αμινοξέων/L}$$

### **2.2.3.1 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου**

Η μέθοδος προσδιορισμού του αμμωνιακού δυναμικού των σταφυλιών (Scheiner D., 1976) βασίζεται στην αντίδραση της αμμωνίας με αλκαλικό διάλυμα υποχλωριώδους παρουσία φαιολικού καταλύτη, σχηματίζοντας ινδοφαινόλη η οποία έχει μπλε χρώμα. Η συγκέντρωση της ινδοφαινόλης υπολογίζεται φωτομετρικά στα 635nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης αμμωνίας στις ράγες. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 100μL δείγματος οίνου, 2mL φαιολικού καταλύτη και 3mL αλκαλικού διαλύματος υποχλωριώδους. Τα διαλύματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα για το σχηματισμό της ινδοφαινόλης, και κατόπιν γίνεται η μέτρηση στα 635nm. Οι απορροφήσεις μεταφράζονται σε ισοδύναμα mg αζώτου/L με χρήση πρότυπης καμπύλης.

### **2.2.3.2 Προσδιορισμός αζώτου βασικών αμινοξέων**

Η μέθοδος προσδιορισμού των αφομοιώσιμων από τις ζύμες αμινοξέων (Dukes B. and Butzke C., 1998) βασίζεται στη δημιουργία παραγώγων των πρωτοταγών αμινομάδων με το o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine (OPA/NAC). Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός παραγώγων ισοϊνδολης, των οποίων η συγκέντρωση προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 335nm. Στην αντίδραση δε λαμβάνει μέρος η προλίνη, η οποία είναι μη αφομοιώσιμη από της ζύμες. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 50μL δείγματος οίνου και στη συνέχεια 3mL διαλύματος OPA/NAC. Οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για 10min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν μετράται η απορρόφηση στα 335nm. Οι μετρήσεις εκφράζονται σε ισοδύναμα mg αζώτου/L με χρήση πρότυπης καμπύλης.

### **2.3.2 Προσδιορισμός ολικών ανθοκυανών και φαιολικών συστατικών**

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ανθοκυανών και των ολικών φαιολικών στις ράγες των ερυθρών ποικιλιών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Pland P., *et al.*, 2004. Η μέθοδος του «Pland» χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ολικών ανθοκυανών και φαιολικών σε ερυθρές ποικιλίες. Η μέθοδος στηρίζεται στην

παραδοχή ότι σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 1 παρατηρείται πλήρης αποδιοργάνωση των κυτταρικών μεμβρανών και ολική εκχύλιση των ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών από τα χυμοτόπια των κυττάρων. Στη συνέχεια, τα συστατικά που έχουν εκχυλιστεί είναι εμφανή στα 700, 520 και 280nm του φασματοφωτόμετρου. Σύμφωνα με τη διαδικασία εφαρμογής της μεθόδου, δείγμα 50 ραγών ζυγίζεται και ομογενοποιείται με τη χρήση UltraTurrax στις 24.000rpm για 30sec. Για την εκχύλιση των ανθοκυανών και των ολικών φαινολικών συστατικών, σε δοκιμαστικό σωλήνα χρησιμοποιείται 1g του ομογενοποιημένου δείγματος και 10ml υδατικού διαλύματος αιθανόλης (50% υδατικό διάλυμα αιθανόλης διορθωμένο σε pH 2 με HCl). Το διάλυμα μένει για 1h υπό ανάδευση προκειμένου να εκχυλιστεί το 94% των ανθοκυανών του δείγματος. Ακολουθείται φυγοκέντριση στις 4000rpm για 10min και λαμβάνονται άμεσα από το υπερκείμενο της φυγοκέντρισης 0,5ml, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθενται 10ml υδατικού διαλύματος HCl (1M). Τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος για τρεις ώρες και στη συνέχεια λαμβάνονται οι απορροφήσεις στα 700, 520 και 280nm. Η απορρόφηση στα 700nm δείχνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων στα 520 και 280nm ως προς την διαύγειά τους. Όταν στα 700nm η τιμή είναι μεγαλύτερη του 0,01 (700nm>0,01), τότε το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο. Οι τιμές των απορροφήσεων στα 520 και 280nm χρησιμοποιούνται στους τύπους:

$$i) \text{Ανθοκυάνες (mg/ράγα)} = \frac{A_{520}}{500} \times \text{συντ.αραίωσης} \times \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (mL)}}{100} \times \frac{\text{βάρους 50 ραγών (g)}}{\text{βάρους δείγματος 50 εκχύλισης (g)}} \times \frac{1000}{50}$$

$$ii) \text{Ανθοκυάνες (mg/g}_{\text{ράγας}}) = \frac{\text{ανθοκυάνες (mg / ράγα)}}{\text{βάρους 50 ραγών (g)}/50}$$

$$iii) \text{Ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα (AU/ράγα)} =$$

$$A_{280} \times \text{συντ.αραίωσης} \times \frac{\text{τελικός όγκος εκχύλισης (mL)}}{100} \times \frac{\text{βάρους 50 ραγών (g)}}{\text{βάρους δείγματος 50 εκχύλισης (g)}} \times \frac{1}{50}$$

$$iv) \text{Ολικά φαινολικά. (AU/g}_{\text{ράγας}}) = \frac{\text{ολικά φαινολικά (AU / ράγα)}}{\text{βάρους 50 ραγών (g)}/50}$$

### 2.3.3 Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών, περιεκτικότητας ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών

Για τον προσδιορισμό της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών και των ταννινών και τον προσδιορισμό του φαινολικού δυναμικού των ραγών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Glories (Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000). Η «Glories» θεωρείται η πιο ακριβής μέθοδος εκτίμησης της φαινολικής ωρίμανσης των ραγών των ερυθρών ποικιλιών. Δίνει αποτελέσματα σχετικά με το ολικό δυναμικό σε ανθοκυάνες και ταννίνες, την εκχυλισματικότητα των ανθοκυανών και το βαθμό ωρίμανσης των γιγάρτων. Στην πράξη η μέθοδος αποτελεί ένα μέσο διάκρισης του φαινολικού δυναμικού μιας ποικιλίας και της δυνατότητας εκχύλισης των ανθοκυανών που εμπεριέχει. Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 1 και ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3,6. Σε pH 1 γίνεται εκχύλιση όλων των ανθοκυανών του δείγματος και σε pH 3,6 προσομοιώνουν οι πραγματικές συνθήκες εκχύλισης και η απελευθέρωση των ανθοκυανών από το φλοιό των ραγών και εξαρτάται από το πορώδες των κυτταρικών μεμβρανών. Σύμφωνα με τη διαδικασία εφαρμογής της μεθόδου, δείγμα 50 ραγών ζυγίζεται και ομογενοποιείται με τη χρήση UltraTurrax στις 24.000rpm για 30sec. Σε μια κωνική φιάλη προστίθενται 20 g ομογενοποιημένου πολτού ραγών και 20 ml διαλύματος HCl 0.1N με pH 1, ενώ σε μια άλλη 20 g ομογενοποιημένου πολτού και 20 ml διαλύματος τρυγικού οξέος 5g/L με pH 3,6. Οι δυο φιάλες παραμένουν σε σκοτεινό μέρος για τέσσερις ώρες. Εν συνεχεία, τα διαλύματα μεταφέρονται σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου και φυγοκεντρώνται για 10 min στις 4000rpm και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ανθοκυανών με τη μέθοδο αποχρωματισμού με υγρό SO<sub>2</sub> (Ribereau-Gayon P., *et al.*, 1999) στα εκχυλίσματα pH 1,0 και pH 3,6. Στη συνέχεια το εκχύλισμα από το pH 3,6 αραιώνεται 1:100 με απιονισμένο H<sub>2</sub>O και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280nm. Για τη μέτρηση του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών χρησιμοποιείται η απορρόφηση του εκχυλίσματος με pH 3.6 σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\Delta.\Phi.O. = A_{280} * 100$$

Η ποσότητα των ανθοκυανών και των ταννινών δίνεται από τις σχέσεις:

$$i) \text{ Ολικές ανθοκυάνες (TA) σε g/L} = (A_{pH1/H2O} - A_{pH1/SO2}) * \frac{885.3}{1000}$$

$$\text{ii) Εκχυλίσιμες Ανθοκυάνες (EA) σε g/L} = (A_{\text{pH}3.6/\text{H}_2\text{O}} - A_{\text{pH}3.6/\text{SO}_2}) * \frac{885.3}{1000}$$

$$\text{iii) Εκχυλισιμότητα Ανθοκυανών στον οίνο (AE\%)} = 100 * \frac{TA - EA}{TA}$$

$$\text{iv) Ταννίνες φλοιών (T}_{\text{skins}}) \text{ σε g/L} = EA * 40$$

$$\text{v) Ταννίνες φλοιών ως προς το συνολικό φαινολικό φορτίο (MT}_{\text{skins}}\%) = \frac{T_{\text{skins}}}{A_{280, \text{pH}3.6}} * 100$$

$$\text{vi) Ταννίνες γιγάρτων (T}_{\text{seeds}}) \text{ σε g/L} = A_{280/\text{pH}3.6} * 100 - T_{\text{skins}}$$

$$\text{vii) Ταννίνες γιγάρτων ως προς το συνολικό φαινολικό φορτίο (MT}_{\text{seeds}}\%) = \frac{T_{\text{seeds}}}{A_{280, \text{pH}3.6}} * 100$$

## 2.4 Αναλύσεις οίνων

### 2.4.1. Κλασσικές αναλύσεις στους οίνους

Σε όλους τους παραχθέντες οίνους πραγματοποιήθηκαν όλες οι κλασσικές αναλύσεις προσδιορισμού ολικής και ενεργού οξύτητας (pH), πτητικής οξύτητας, αναγόντων σακχάρων και αλκοόλης.

#### 2.4.1.1. Προσδιορισμός ολικής και ενεργού οξύτητας (pH)

Για τον προσδιορισμό της ενεργού οξύτητας των οίνων χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό pH-μετρο HANNA HI 112.

Ο προσδιορισμός της ολικής οξύτητας πραγματοποιείται με τιτλοδότηση, με εξουδετέρωση των όξινων ομάδων του δείγματος με αλκαλικό διάλυμα (NaOH 0.1M) παρουσία δείκτη (κυανό της βρωμοθυμόλης). Η ολική οξύτητα εκφράζεται σε ισοδύναμα γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο (OIV-MA-AS313-01).

#### 2.4.1.2 Προσδιορισμός πτητικής οξύτητας

Ο προσδιορισμός της πτητικής οξύτητας πραγματοποιήθηκε με τιτλοδότηση των πτητικών οξέων που διαχωρίζονται από τον οίνο με απόσταξη με υδρατμούς και ανακαθαρισμό των ατμών (Amerine M. and Ough C., 1980) και εκφράζεται σε g οξικού οξέος ανά L οίνου (OIV-MA-AS313-02).

### **2.4.1.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων**

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων των οίνων, σακχάρων δηλαδή με ελεύθερη αλδεϋδική ή κετονική ομάδα, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Luff και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε γραμμάρια σακχάρων ανά λίτρο (OIV-MA-AS311-01A).

### **2.4.1.4 Προσδιορισμός αλκοολικού τίτλου**

Ο προσδιορισμός βασίζεται στην απόσταξη της αλκοόλης του οίνου και την συνέχεια την μέτρησή της στο απόσταγμα με αραιόμετρο Gay-Lussac. Εκφράζεται σε επί τοις εκατό αιθανόλη κατ' όγκο (OIV-MA-AS312-01A).

## **2.4.2 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και ταννινών**

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών των οίνων εφαρμόστηκε η μέθοδος του Δείκτη Ολικών Φαινολών (ΔΦΟ) των Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau-Gayon P. και Stonestreet E. (1965), καθώς και η μέθοδος Folin-Ciocalteu, όπως περιγράφεται από τους Waterman P. and Mole S (1994). Για τον προσδιορισμό των ταννινών χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι: η μέθοδος Harbertson J., *et al.* (2002) γνωστή ως μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με δέσμευση πρωτεϊνών και η μέθοδος Sarneckis C., *et al.* (2006) γνωστή ως μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με προσθήκη μεθυλ-κυτταρίνης.

### **2.4.2.1 Προσδιορισμός Δείκτη Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)**

Ο δείκτης Ολικών Φαινολών αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη ένδειξη των ολικών φαινολικών συστατικών που βρίσκονται στον οίνο. Γίνεται εφαρμογή της μεθόδου ΔΦΟ όπως περιγράφεται από τους Flanzky και Roux (1958) και Ribéreau-Gayon (1966), βάσει της οποίας μετράται η απορρόφηση αραιωμένου δείγματος οίνου σε μήκος κύματος 280nm του υπεριώδους φωτός. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως «δείκτης ολικών φαινολικών» πολλαπλασιάζοντας την απορρόφηση επί του συντελεστή αραιώσεως του δείγματος. Βέβαια, αν και οι βενζολικοί πυρήνες έχουν τη μέγιστη απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος, ορισμένα μόρια, όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, δεν παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης στο ίδιο μήκος κύματος. Παρόλα αυτά, αφού τα μόρια αυτά απαντώνται στον οίνο σε πολύ χαμηλές



συγκεντρώσεις, το σφάλμα της μέτρησης θεωρείται αμελητέο. Η τιμή του δείκτη ολικών φαινολών κυμαίνεται από 6 έως 120 (Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000).

#### **2.4.2.2. Μέθοδος Folin – Ciocalteu**

Με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, που αναφέρεται από τους Waterman & Mole (1994), προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενός δείγματος οίνου. Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών σε αλκαλικό περιβάλλον, παρουσία φωσφοροβολφραμικού και φωσφορομολυβδαινικού οξέος. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε ογκομετρική φιάλη των 10mL τοποθετούνται 10μL οίνου, 0,5 mL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και 1.5mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%. Ακολουθεί ανάδευση και συμπλήρωση του όγκου με απιονισμένο νερό. Παράλληλα δημιουργείται ένα τυφλό δείγμα (blanc) όπου αντί για οίνο περιέχει νερό. Μετά από παραμονή 30 λεπτών για την ανάπτυξη του χρώματος, μετριοούνται οι απορροφήσεις των διαλυμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 765nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με το τυφλό δείγμα (blanc). Το αποτέλεσμα εκφράζεται mg γαλλικού οξέος ανά λίτρο που προκύπτουν από την καμπύλη αναφοράς, η χάραξη της οποίας γίνεται με διαλύματα γαλλικού οξέος γνωστών συγκεντρώσεων (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ε., 1982, Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000).

#### **2.4.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με δέσμευση από πρωτεΐνες (Harbertson J., *et al.*, 2003)**

Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών δείγματος οίνου ή ράγας. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ταννινών με άλλα μόρια, όπως η αλβουμίνη (πρωτεΐνη) και τη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων, τα οποία καθιζάνουν. Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωση των ταννινών μετά από αντίδραση με χλωριούχο σίδηρο. Ο χλωριούχος σίδηρος αντιδρά με τα μόρια των πολυφαινολών και σχηματίζει σύμπλοκα Fe-(OR)<sub>6</sub> (το OR αντιστοιχεί σε ιονισμένα φαινολικά μόρια) τα οποία έχουν ιώδες χρώμα σε αλκαλικό διάλυμα και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση στα 510 nm. Η συγκέντρωση των ταννινών στα σύμπλοκα ταννίνης-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης του δείγματος. Για την ποσοτική παραλαβή του συνόλου των ταννινών του δείγματος είναι απαραίτητο το πρωτεϊνικό διάλυμα να περιέχει διπλάσια ποσότητα αλβουμίνης σε σχέση με την συγκέντρωση των ταννινών. Περίσσεια πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής συσχετίζονται

ισχυρά με τη στυπτικότητα καθώς καταβυθίζονται κυρίως προανθοκυανιδίνες με βαθμό πολυμερισμού που κυμαίνεται από 4 έως 8. Ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημική εκτίμηση της στυπτικότητας των οίνων (Mercurio *et al.* 2008). Το δείγμα αραιώνεται με model wine (υδραλκοολικό διάλυμα 12% v/v αιθανόλης, 5g/l τρυγικό οξύ, με pH 3.5) ανάλογα με τη συγκέντρωση των ταννινών του. Το ποσοστό αραιώσης προσδιορίζεται πειραματικά ανάλογα με το δείγμα, δηλαδή δημιουργούνται διαφορετικές αραιώσεις και ακολουθούν μετρήσεις. Για την μέθοδο χρησιμοποιούνται 500 ml οίνου ή αραιωμένου δείγματος και 1 ml πρωτεϊνικού διαλύματος bovine serum albumin (BSA). Γίνεται ήπια ανάδευση για 15 min και το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13500 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται 250 ml μη πρωτεϊνικού διαλύματος χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 min στις 13500 rpm και στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στο ίζημα προστίθενται 875 ml διαλύματος θεικού νατρίου τριαιθανολαμίνης (TEA-SDS) και αφήνεται σε ηρεμία για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αναδεύεται σε vortex για να διαλυθεί το ίζημα. Μετά την ανάδευση μετρείται η απορρόφηση στα 510 nm ( $A_1$ ) με κυψελίδα στένωσης. Στη συνέχεια προστίθενται 125 ml διαλύματος  $FeCl_3$  και μετά από 15 min μετρείται ξανά η απορρόφηση στα 510 nm ( $A_2$ ). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου (blanc) χρησιμοποιείται διάλυμα TEA-SDS. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με βάση τη διαφορά μεταξύ των δύο απορροφήσεων στα 510nm ( $A_2 - A_1$ ). Στη συνέχεια με την χρήση πρότυπης καμπύλης, τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα mg κατεχίνης ανά λίτρο.

#### **2.4.2.4 Μέθοδος προσδιορισμού ταννινών με την προσθήκη μεθυλ-κυτταρίνης (methyl-cellulose) (Sarneckis C., *et al.*, 2006)**

Η συγκεκριμένη μέθοδος μετράει το σύνολο των ταννινών στον οίνο. Η ανάλυση βασίζεται στην αντίδραση ενός πολυμερούς, όπως η μεθυλ-κυτταρίνη που είναι ένας πολυσακχαρίτης, με τις ταννίνες του οίνου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αδιάλυτων πολυμερών συμπλόκων τα οποία στη συνέχεια καθιζάνουν. Η ανάλυση βασίζεται στην διαφορά των τιμών απορρόφησης στα 280 nm ( $A_{280}$ ) των διαλυμάτων με και χωρίς την καθίζηση των συμπλοκοποιημένων ταννινών, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Η μεθυλ-κυτταρίνη δεν απορροφά στα 280nm και συνεπώς δεν παρεμβάλλεται στη μέτρηση. Για τον προσδιορισμό, είναι απαραίτητη η παρουσία ενός μάρτυρα (blanc), δηλαδή διαλύματος οίνου στο οποίο δεν γίνεται προσθήκη αντιδραστήριου μεθυλ-

κυτταρίνης και δείγματος οίνου στον οποίο έχει γίνει προσθήκη μέθυλ-κυτταρίνης. Η απορρόφηση του δείγματος αναφοράς (blanc) στα 280nm δείχνει την τιμή για όλες τις φαινολικές ενώσεις (σύνολο φαινολικών) που υπάρχουν στον οίνο ( $A_{280,bl}$ ), ενώ η απορρόφηση στα 280nm του επεξεργασμένου δείγματος με μέθυλ-κυτταρίνη, εκφράζει τις φαινολικές ενώσεις που παραμένουν εν διαλύσει μετά την κατακρήμνιση των συμπλόκων ταννινών με μέθυλ-κυτταρίνη ( $A_{280,s}$ ). Από τη διαφορά:

$A_{280,tan} = (A_{280,bl}) - (A_{280,s})$  υπολογίζεται η απορρόφηση που οφείλεται στις ταννίνες. Στη συνέχεια από καμπύλη αναφοράς, γνωστών συγκεντρώσεων, υπολογίζεται η συγκέντρωση των ταννινών, σε ισοδύναμα mg κατεχίνης, στο διάλυμα μέτρησης (Cds).

Η τελική συγκέντρωση των ταννινών στο δείγμα οίνου, σε (mg/l), είναι:

$C_{wine} = Cds * 40 * (\text{αραίωση δείγματος οίνου})$  όπου το 40 είναι ο συντελεστής αραίωσης του δείγματος στο διάλυμα μέτρησης.

### **2.4.3 Προσδιορισμός χρωματικών χαρακτηριστικών και ανθοκυανών**

Ο προσδιορισμός των χρωματικών χαρακτηριστικών των οίνων έγινε με βάση την Ένταση και την Απόχρωσή τους σύμφωνα με τη μέθοδο Glories Y. (1984). Επιπλέον, στους ερυθρούς οίνους, τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τους χρωματικούς δείκτες Somers και με μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) για τον προσδιορισμό των μονομερών των ανθοκυανών.

#### **2.4.3.1 Χρωματικά χαρακτηριστικά**

Για τον προσδιορισμό της έντασης και της απόχρωσης του χρώματος των οίνων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Glories Y. (1984), κατά την οποία λαμβάνονται οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 420, 520 και 620 nm, από φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού, για τους ερυθρούς οίνους, ενώ για τους λευκούς οίνους η απορρόφηση στα 420nm. Η ένταση του χρώματος, στην περίπτωση των ερυθρών οίνων, είναι το άθροισμα και των τριών απορροφήσεων, ενώ η απόχρωση είναι ο λόγος της απορρόφησης στα 420 nm προς αυτής στα 520 nm. Για τους λευκούς οίνους, η ένταση και απόχρωση ταυτίζονται και αντιστοιχούν στην απορρόφηση στα 420nm.

Το χρώμα των ερυθρών οίνων είναι το άθροισμα των χρωμάτων κίτρινου, κόκκινου και κυανού. Τα φάσματα απορρόφησής τους παρουσιάζουν ένα μέγιστο στα 520 nm, το οποίο ελαττώνεται με την παλαίωση, και ένα ελάχιστο στα 420 nm, που κατά την παλαίωση αυξάνει ή παραμένει σταθερό. Τα 420 nm είναι χαρακτηριστικό μήκος

κύματος του κίτρινου χρώματος, το οποίο οφείλεται στις συμπυκνωμένες ταννίνες και αυξάνει με τον πολυμερισμό και την οξείδωση των μορίων αυτών. Τα 520 nm είναι χαρακτηριστικό μήκος κύματος του κόκκινου χρώματος και οφείλεται στο καθαρό ερυθρό χρώμα των ελεύθερων ανθοκυανών που βρίσκονται υπό τη μορφή φλαβυλίου. Η απορρόφηση στα 620 nm εκφράζει το κυανό χρώμα των νέων ερυθρών οίνων, το οποίο οφείλεται στις ανθοκυάνες όταν αυτές βρίσκονται με τη μορφή της άνυδρης βάσης. Η ένταση αντιπροσωπεύει την ποσότητα του χρώματος και παρουσιάζει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των ποικιλιών. Είναι καθαρός αριθμός και οι τιμές της κυμαίνονται από 0.3 έως 1.8. Η απόχρωση αντιπροσωπεύει την εξέλιξη του χρώματος προς το πορτοκαλί και εκφράζει το βαθμό οξείδωσης των οίνων. Όσο πιο οξειδωμένος είναι ο οίνος, τόσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της απόχρωσης. Οι νέοι οίνοι παρουσιάζουν τιμές απόχρωσης μεταξύ 0.5 – 0.7 που αυξάνονται κατά την παλαίωση (Χαρβαλιά, Α. και Μπενά-Τζούρου, Ε., 1982, , Κουράκου, Σ., 1998, Ribéreau-Gayon, P., *et al.*, 2000).

#### **2.4.3.2 Χρωματικοί δείκτες Somers**

Το χρώμα του ερυθρού οίνου είναι αποτέλεσμα της συνεισφοράς τόσο των μονομερών, ελεύθερων ανθοκυανών όσο και των μορφών των πολυμερισμένων χρωστικών. Αρχή της μεθόδου είναι σχέση ελεύθερων και πολυμερισμένων έγχρωμων συστατικών σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα. Λόγω της πολυπλοκότητας και της πιθανής μεταβλητότητας στα συστατικά του χρώματος του οίνου, δεν είναι δυνατόν να υπάρχει ακριβής χημικός ορισμός του χρώματος, ακόμη και στους νέους οίνους. Ωστόσο, πολύ μεγάλες διακυμάνσεις στην ισορροπία των χρωστικών, μπορούν να αποδειχθούν εύκολα με τη μέθοδο Somers. Οι δείκτες που υπολογίζονται από τη μέθοδο βασίστηκαν στην μελέτη των ακόλουθων περιπτώσεων:

1. Οι ανθοκυάνες αποχρωματίζονται με την προσθήκη περίσσειας υγρού SO<sub>2</sub> στο pH του οίνου. Το υπολειμματικό χρώμα μετά από μια τέτοια επεξεργασία ενός ερυθρού οίνου, οφείλεται στις πολυμερισμένες μορφές των χρωστικών. Η συνεισφορά των πολυμερισμένων ανθοκυανών είναι μόλις 0-5% (στα 520nm) στους πρόσφατα κατασκευασμένους οίνους, αλλά υπάρχει προοδευτική αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και της παλαίωσης.
2. Η ακεταλδεΐδη δεσμεύεται πολύ ισχυρά με το SO<sub>2</sub> σε σύγκριση με τις ανθοκυάνες. Η περίσσεια ακεταλδεΐδης θα προκαλέσει αύξηση της απορρόφησης, λόγω ελεύθερων

ανθοκυανών που προηγουμένως μπορεί να είχαν αποχρωματιστεί από την προσθήκη του SO<sub>2</sub>.

3. Σε pH<1,0, οι ανθοκυάνες εμφανίζονται εξ' ολοκλήρου με τη μορφή του έγχρωμου κατιόντος του φλαβυλίου, συνεπώς, σε αυτή την περίπτωση, μετά την οξύνιση, παρατηρείται πολύ μεγάλη αύξηση της απορρόφησης στα 520nm. Αντίθετα, τα σύμπλοκα των πολυμερισμένων ανθοκυανών επηρεάζονται πολύ λιγότερο από το χαμηλό pH (Somers T. and Evans M., 1976).

Για την παρούσα μέθοδο απαιτείται φυγοκέντριση του δείγματος για 5 λεπτά στις 4000 rpm. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζονται τα ακόλουθα διαλύματα:

1. Σε 4,5 ml model wine προστίθενται 500 μl, αναδεύονται στο vortex και άμεσα λαμβάνονται οι απορροφήσεις στα 420nm (A<sub>420.MW</sub>) και στα 520nm (A<sub>520.MW</sub>).

2. Σε 4,5 ml διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> προστίθενται 500 μl οίνου, αναδεύονται σε vortex και παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στο σκοτάδι, για μια ώρα. Στο τέλος του χρόνου μετριέται η απορρόφηση στα 520nm (A<sub>520.SO2</sub>).

3. Σε 4,5 ml διαλύματος ακεταλδεϋδης προστίθενται 500 μl οίνου, αναδεύονται στο vortex και παραμένουν στο σκοτάδι για μια ώρα. Στο τέλος του χρόνου μετριοούνται οι απορροφήσεις στα 420nm (A<sub>420.ACET</sub>) και στα 520nm (A<sub>520.ACET</sub>).

4. Σε 4,9 ml διαλύματος HCl προστίθενται 100 μl οίνου, αναδεύονται στο vortex και παραμένουν στο σκοτάδι για τρεις ώρες. Στο τέλος του χρόνου μετριοούνται οι απορροφήσεις στα 280nm (A<sub>280.HCl</sub>) και στα 520nm (A<sub>520.HCl</sub>).

Για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιείται ως μάρτυρας (blanc) απιονισμένο νερό.

Από τις απορροφήσεις που συλλέχθηκαν παραπάνω υπολογίζονται οι παρακάτω

δείκτες:

Χημική ηλικία 1 (χωρίς μονάδες) =  $A_{520.SO2} / A_{520.ACET}$

Χημική ηλικία 2 (χωρίς μονάδες) =  $A_{520.SO2} / (5 * A_{520.HCl})$

Βαθμός ιονισμού ανθοκυανών (%) =  $\{[(10 * A_{520.MW}) - (10 * A_{520.SO2})] / [(50 * A_{520.HCl}) - [1.6667 * (10 * A_{520.SO2})]]\} * 100$

$$\text{Ολικές ανθοκυάνες (mg/L)} = 20 * (50 * A_{520.HCl} ) - [1.6667 * (10 * A_{520.SO_2} )]$$

$$\text{Ένταση χρώματος (διορθωμένη ως προς SO}_2 \text{ ) (AU)} = (A_{420.ACET} + A_{520.ACET} ) * 10$$

$$\text{Απόχρωση (AU)} = A_{420.MW} / A_{520.MW}$$

$$\text{Ολικά φαινολικά συστατικά (AU)} = (A_{280.HCl} * 50) - 4$$

$$\text{Έγχρωμα συστατικά παρουσία SO}_2 \text{ (AU)} = A_{520.SO_2} * 10$$

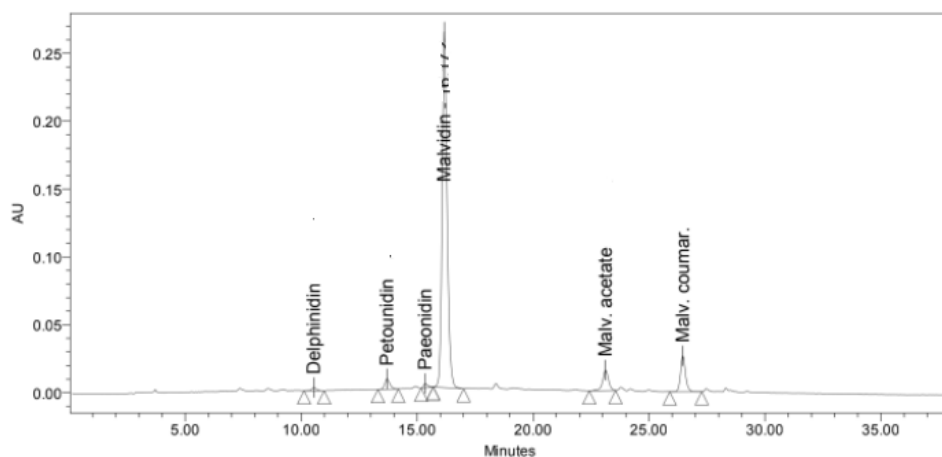
#### 2.4.3.4 Προσδιορισμός ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών με HPLC βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Kallithraka S., *et al.*, 2005). Τα δείγματα οίνου περνάνε από φίλτρο σύριγγας 0,2μm και τοποθετούνται σε φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη για HPLC. Τα χαρακτηριστικά του προγράμματος έκλυσης που εφαρμόστηκε εμφανίζονται στον κάτωθι Πίνακα .

Μέθοδος	Προδιορισμός ανθοκυανών
Στήλη	Restek Pinnacle II C18 (250 x 4.0 mm x 5 μm )
Ρυθμός ροής Διαλυτών	1 mL/min
Ανιχνευτής	diode array (DAD; Jasco MD-910)
Μήκος κύματος ανίχνευσης	520nm
Ποσότητα ένεσης (injection)	20μL
Διαλύτες	A: 10% φορμικό οξύ (CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) σε νερό καθαρότητας HPLC (dd H <sub>2</sub> O) B: μεθανόλη (MeOH) καθαρότητας HPLC

<b>Πρόγραμμα HPLC</b>	Χρόνος σε min	0	22	30	35
	% διαλύτη A	95	50	5	95
	% διαλύτη B	5	50	95	5
<b>Καμπύλη αναφοράς</b>	Μαλβιδίνη (MvI) mg/L	$y = 3.1409x + 0,0122$			
<b>Έκφραση αποτελεσμάτων</b>	Ισοδύναμα MvI σε mg/L				

Για τον προσδιορισμό των ανθοκυανών για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC Jasco (Tokyo, Japan), αποτελούμενο από μια αντλία PU-2089 plus, μια βαλβίδα έγχυσης Rheodyne model 7725i με ενσωματωμένο loop 100μl και ένα ανιχνευτή diode array (DAD; Jasco MD-910). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Pinnacle II C18 (250 x 4.0 mm x 5 μm ) από την εταιρία Restek. Η ποσοτική έκφραση των 3-O-μονογλυκοζιτών της δελφινιδίνης, πετουνιδίνης, παιονιδίνης, και μαλβιδίνης, καθώς και των οξικών και κουμαρικών εστέρων των ανθοκυανών έγινε σε ισοδύναμα μαλβιδίνης. Μετά την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών εκφρασμένες σε mg/L οίνου. Ένα τυπικό χρωματογράφημα έκλυσης των ανθοκυανών της ποικιλίας Αγιωργίτικο παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα.



#### 2.4.4 Τεστ ταχείας αμαύρωσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ανάπτυξης της αμαύρωσης των λευκών οίνων (Sioumis *et al.*, 2006) είναι μια παραλλαγή αυτής που περιεγράφηκε από τους Singleton and Kramling (1976). Σε γυάλινα φιαλίδια βιδωτού καλύμματος των 45 ml μεταφέρθηκαν 30 ml δείγματος οίνου, αφού προηγουμένως είχαν φυγοκεντρηθεί

στις 4000 στροφές για 15 λεπτά. Τα φιαλίδια γεμίζονται κατά τα 2/3 έτσι ώστε να παραμείνει 1/3 κενός χώρος για να εισέλθει το οξυγόνο και να επέλθει οξείδωση. Έπειτα όλα τα φιαλίδια υποβάλλονται σε θέρμανση υπό σταθερή θερμοκρασία 55° C μέσα σε ειδικό θερμοθάλαμο και συνθήκες σκότους. Τα φιαλίδια αποσύρονται από τον θερμοθάλαμο κάθε 24 ώρες και αφού αφεθούν για διάστημα περίπου μιας ώρας να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος, με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου καταγράφεται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 420nm. Για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου (blanc) χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό. Το περιεχόμενο των κυψελίδων επιστρέφει πάντα στα φιαλίδια από τα οποία αντλήθηκε έτσι ώστε να διατηρηθεί σταθερός ο αρχικός όγκος του δείγματος και ο κενός χώρος. Τα φιαλίδια τοποθετούνται ξανά στον θερμοθάλαμο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 12 μέρες. Για κάθε δείγμα προκύπτει μία καμπύλη μεταβολής της απορρόφησης του μήκους κύματος στα 420 nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Η εκτίμηση της οξειδωσιμότητας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα δίνεται από την εξίσωση  $A_{420}=A_{420,0}+kt$ , όπου θεωρούμε ως  $A_{420}$  τη μεταβολή του χρώματος που προκύπτει στον οίνο,  $A_{420,0}$  την αρχική μέτρηση του χρώματος, συντελεστή  $k$  το ρυθμό μεταβολής του χρώματος και  $t$  το χρονικό διάστημα. Ο συντελεστής  $k$  χαρακτηρίζει την ταχύτητα μεταβολής του χρώματος και για κάθε δείγμα είναι διαφορετικός. Όσο μικρότερη τιμή έχει ο συντελεστής  $k$  τόσο πιο αργά θα εμφανιστούν οι καφέ αποχρώσεις οξείδωσης του οίνου. Για την εκτίμηση του χρώματος κάθε δείγματος υπολογίζεται η % μεταβολή του χρώματος:  $\% \Delta A_{420}=100*(A_{420,12}-A_{420,0})/A_{420,0}$ .

#### **2.4.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης JMP11. Το Students' test χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των δειγμάτων ανά ζεύγη, ώστε να διερευνηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά την εφαρμογή ANOVA ( $p<0.05$ ) ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια αναγράφεται η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων ως  $\pm$  του μέσου όρου αυτών ή ως μπάρες όταν τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε γράφημα. Με  $a, b$  χαρακτηρίζεται η στατιστική διαφορά των δειγμάτων (σε επίπεδο 0.05%), ενώ δείγματα με ίδιο γράμμα δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

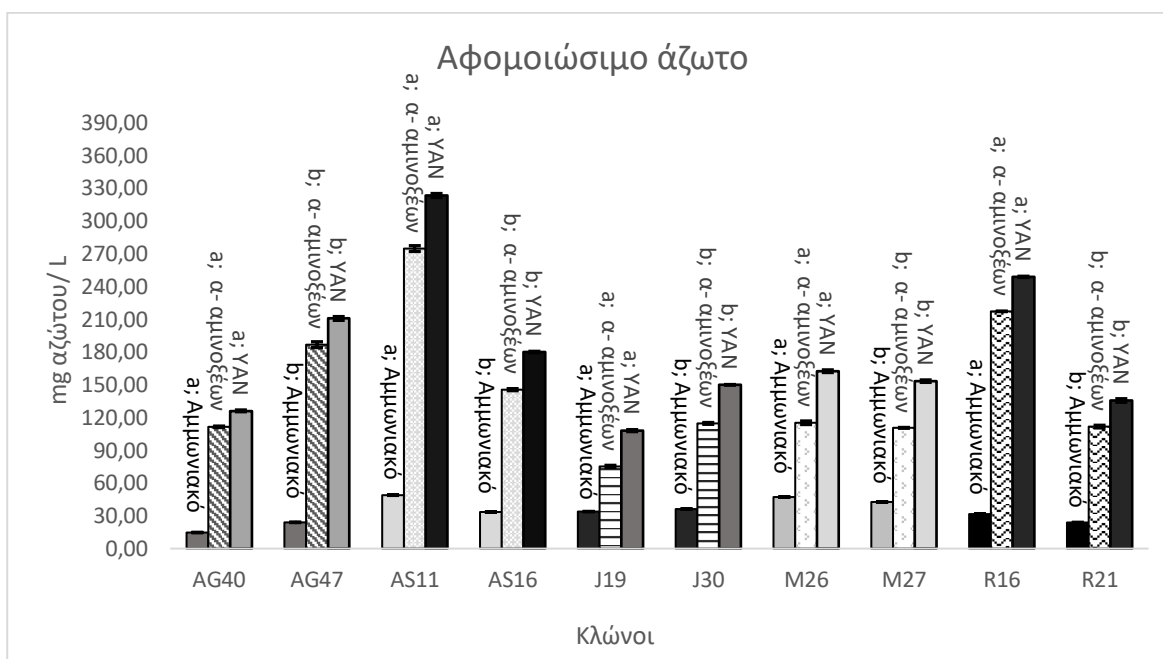


## Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

### 3.1 Αποτελέσματα αναλύσεων στις ράγες

#### 3.1.1 Αφομοιώσιμο άζωτο (YAN)

Τα αναλυτικά αποτελέσματα της μεθόδου παρατίθενται στον Πίνακα Ι του Παραρτήματος.



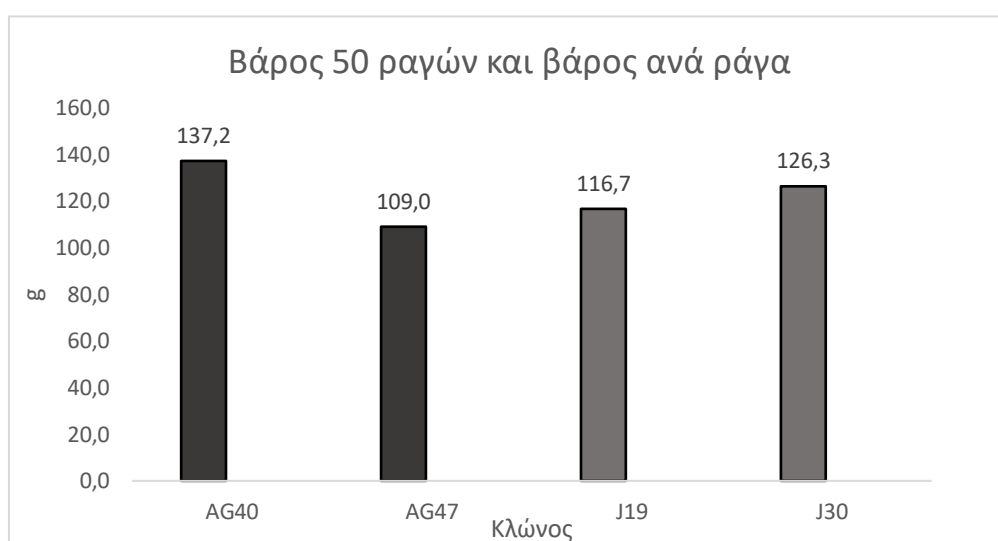
Διάγραμμα 1 Αφομοιώσιμο από τους ζυμομύκητες άζωτο σε mg αζώτου ανά λίτρο. Οι μπάρες δείχνουν την ± τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αμμωνιακού, οργανικού (α-αμινοξέων) και ολικού αφομοιώσιμου αζώτου (YAN) από τους ζυμομύκητες. Το ανόργανο (αμμωνιακό) άζωτο μειώνεται όσο οι ράγες φτάνουν στο στάδιο της ωρίμανσης λόγω της δράσης τρυσαμινάσεων και τις βιοσύνθεσης αμινοξέων (Κοτσερίδης Γ., 2014). Η επάρκεια αζώτου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ομαλή εξέλιξη της ζύμωσης και για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων οίνων. Παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κλώνων όλων των ποικιλιών. Οι κλώνοι AG47, AS11, J30, M26 και R16 είναι αυτοί που παρουσιάζουν τόσο τη μεγαλύτερη συγκέντρωση οργανικού αζώτου όσο και την υψηλότερη συγκέντρωση YAN. Συγκεντρώσεις YAN μικρότερες από 150mg/L δεν επαρκούν για μια ομαλή αλκοολική ζύμωση, ενώ συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου

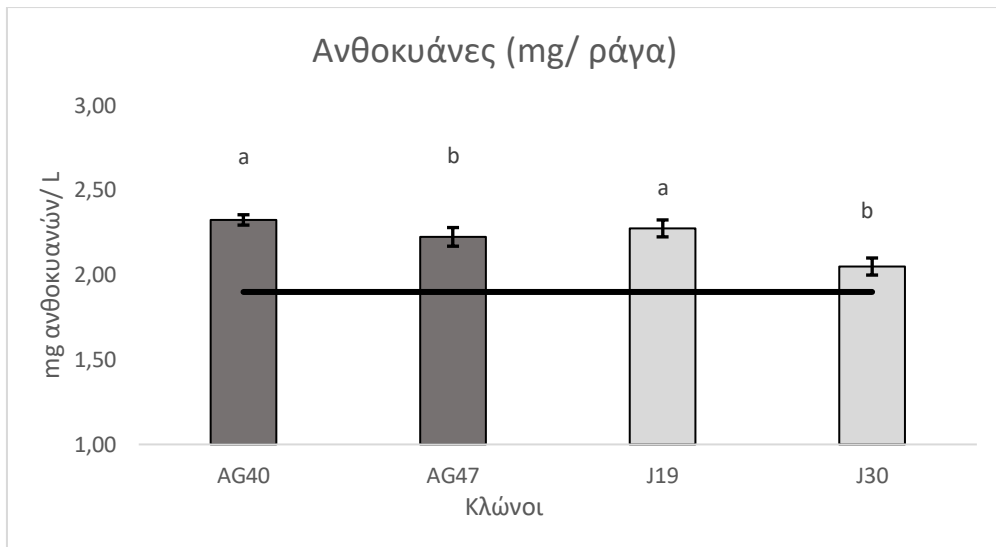
50mg/L, θεωρείται η ελάχιστη ποσότητα για να ξεκινήσει άμεσα η αλκοολική ζύμωση καθώς το ανόργανο άζωτο είναι η περισσότερο αφομοιώσιμη μορφή από τους ζυμομύκητες.

### 3.1.2 Ολικές ανθοκυάνες και φαινολικά συστατικά (Pland)

Τα αναλυτικά αποτελέσματα της μεθόδου καθώς και το βάρος των 50 ραγών και το μέσο βάρος ανά ράγα παρατίθενται στον Πίνακα II του Παραρτήματος.



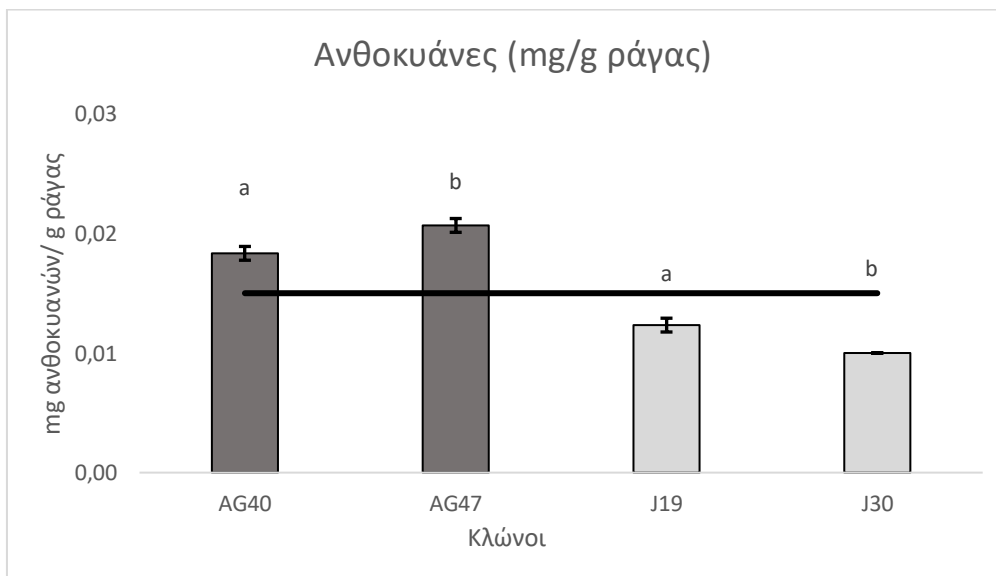
Διάγραμμα 2 Βάρος 50 ραγών και μέσο βάρος ανά ράγα (σε γραμμάρια) των κλώνων των ερυθρών ποικιλιών



Διάγραμμα 3 Ολικές ανθοκυάνες σε mg/ράγα (μέθοδος Pland). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

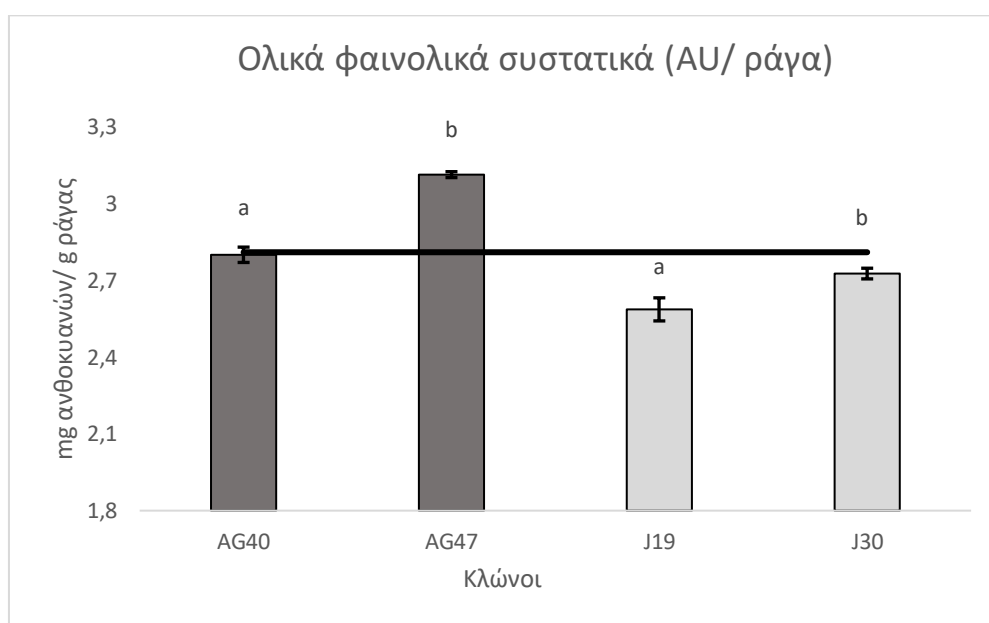
Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζεται το βάρος 50 ραγών και το μέσο βάρος ανά ράγα των κλώνων των ποικιλιών. Η μέγιστη τιμή εμφανίζεται στον κλώνο AG47 για την ποικιλία Αγιωργίτικο και στον κλώνο J30 για την ποικιλία Ξινόμαυρο.

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η συγκέντρωση ανθοκυανών ανά ράγα. Οι κλώνοι AG40 και J19 παρουσιάζουν με στατιστικά σημαντική διαφορά την υψηλότερη τιμή για τις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο, αντίστοιχα.

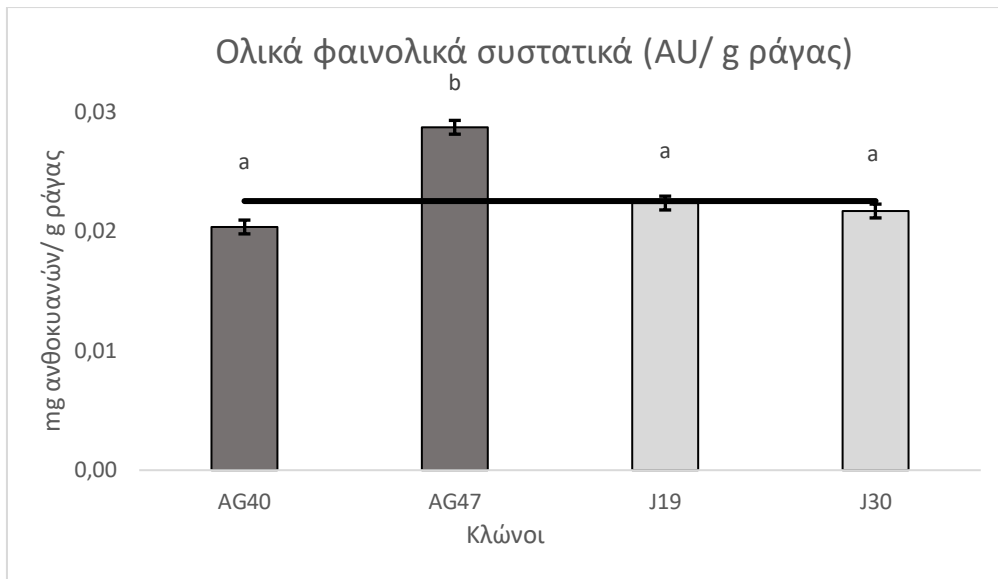


Διάγραμμα 4 Ολικές ανθοκυάνες σε mg/g ράγας (μέθοδος Pland). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 4 αποτυπώνονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών ανά γραμμάριο ράγας. Η υψηλότερη συγκέντρωση για την ποικιλία Αγιωργίτικο εμφανίζεται στον κλώνο AG47 και για την ποικιλία Ξινόμαυρο στον κλώνο J19, με στατιστικά σημαντική διαφορά και στις δύο περιπτώσεις. Είναι προφανές, ότι το μέγεθος της ράγας επηρεάζει τη συγκέντρωση των ανθοκυανών ανά γραμμάριο ράγας. . Για τις ερυθρές ποικιλίες, το μέγεθος της ράγας είναι ιδιαίτερος σημαντικό, καθώς όσο μικρότερη είναι η ράγα, υπάρχει μεγαλύτερη αναλογία φλοιού προς σάρκα, με αποτέλεσμα την καλύτερη και ευκολότερη εκχύλιση των ανθοκυανών και των ταννινών από τους φλοιούς στο γλεύκος (Γ. Κοτσερίδης, 2014).



Διάγραμμα 5 Ολικά φαινολικά συστατικά σε AU/ ράγα (μέθοδος Pland). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

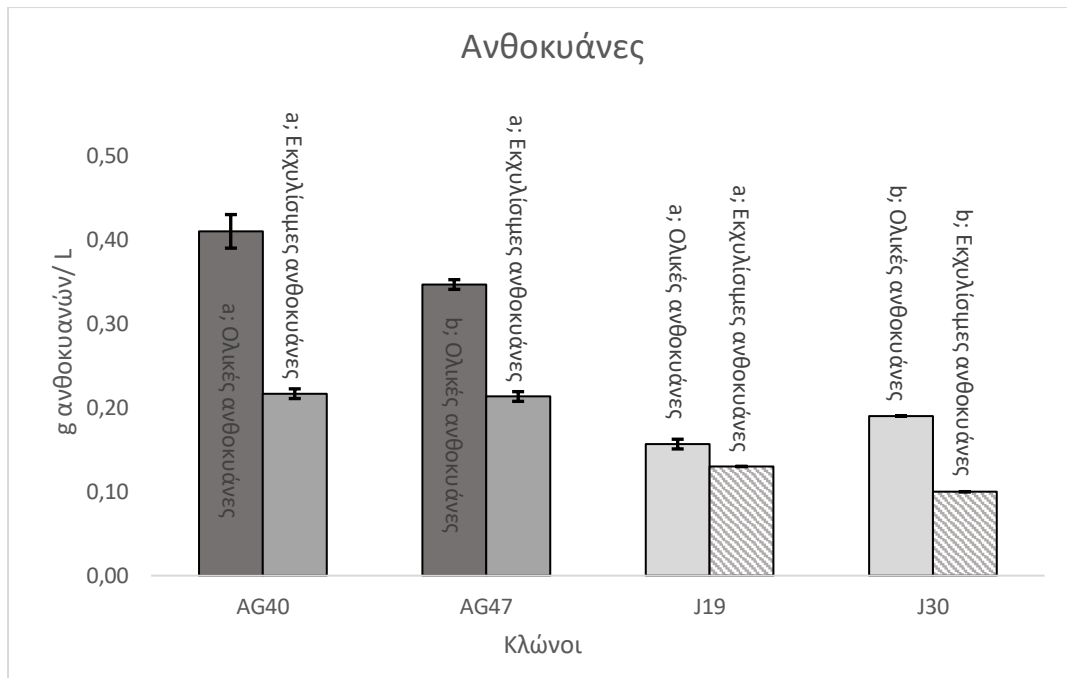


Διάγραμμα 6 Ολικά φαινολικά συστατικά σε AU/g ράγας (μέθοδος Pland). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στα Διαγράμματα 5 και 6 παρουσιάζονται τα ολικά φαινολικά συστατικά ανά ράγα και ανά γραμμάριο ράγας αντίστοιχα. Ο κλώνος AG47 εμφάνισε και για τα δύο χαρακτηριστικά την υψηλότερη τιμή, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Όσον αφορά τους κλώνους της ποικιλίας Ξινόμαυρο, ο κλώνος J30 παρουσίασε μεγαλύτερη τιμή ως προς τα φαινολικά συστατικά ανά ράγα αλλά δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα φαινολικά συστατικά ανά γραμμάριο ράγας, με τον κλώνο J19.

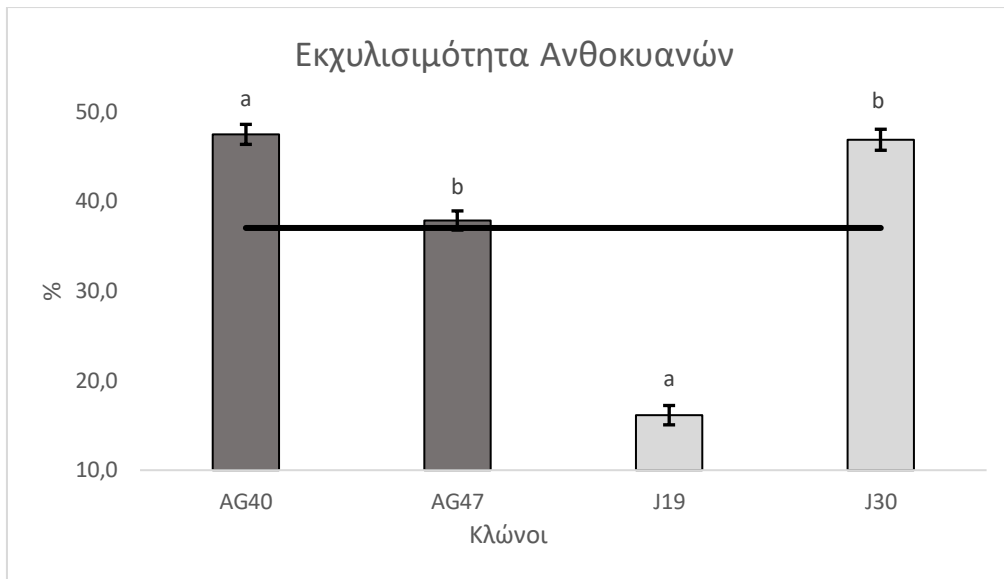
### 3.1.3 Μέθοδος προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών, περιεκτικότητας ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών (Glories)

Τα αναλυτικά αποτελέσματα της μεθόδου παρατίθενται στον Πίνακα III του Παραρτήματος.



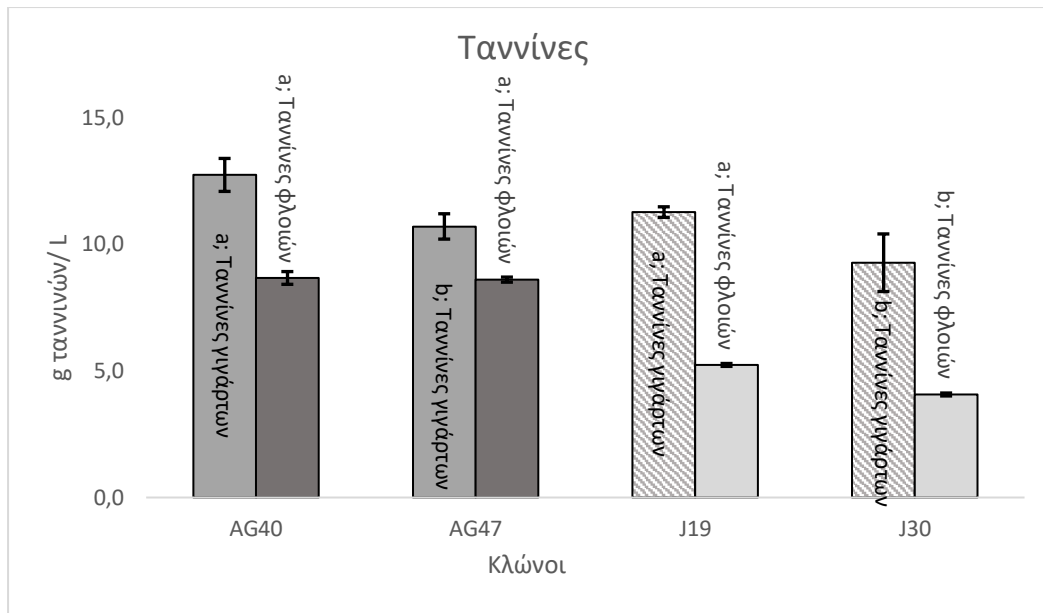
Διάγραμμα 7 Ολικές και εκχυλίσιμες ανθοκυάνες σε γραμμάρια ανά λίτρο γλεύκους (μέθοδος Glories). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις ολικών και εκχυλίσιμων ανθοκυανών σε γραμμάρια ανά λίτρο γλεύκους. Για την ποικιλία Αγιωργίτικο, ο κλώνος AG40 ενώ παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών ανθοκυανών, με στατιστικά σημαντική διαφορά από τον AG47, δεν εμφανίζει μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσιμων ανθοκυανών. Για την ποικιλία Ξινόμαυρο, ο κλώνος J19 είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσιμων ανθοκυανών. Το γεγονός ότι ο κλώνος AG40 ενώ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ως προς τις ολικές ανθοκυάνες, δεν παρουσιάζει και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση εκχυλίσιμων, πιθανών οφείλεται σε μικρότερη αναλογία φλοιού προς σάρκας ( Διάγραμμα 2) ή στο γεγονός ότι οι σταφυλές του συγκεκριμένου κλώνου δεν ήταν στο στάδιο της φαινολικής τους ωρίμανσης όταν πραγματοποιήθηκε ο τρυγητός.



Διάγραμμα 8 Δείκτης εκχυλισιμότητας ανθοκυανών σε ποσοστό επί τοις εκατό (μέθοδος Glories). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

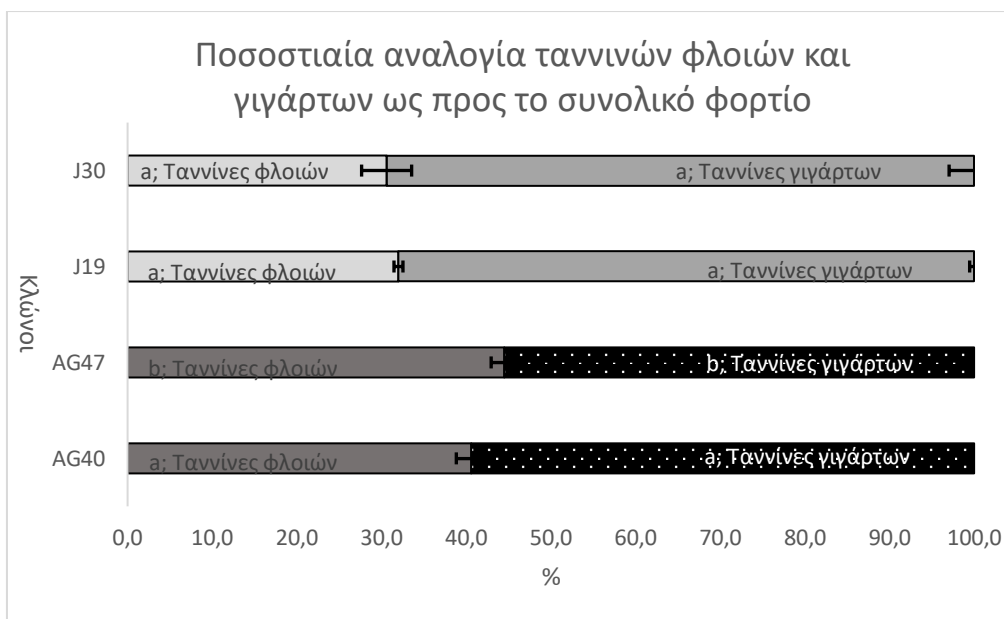
Ο δείκτης εκχυλισιμότητας ανθοκυανών (AE%) υποδεικνύει τον βαθμό δυσκολίας εκχύλισης των ανθοκυανών στον οίνο. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του δείκτη τόσο πιο δύσκολη είναι η εκχύλιση των ανθοκυανών από τους φλοιούς στον εν ζυμώση οίνο. Ο δείκτης AE% δείχνει έμμεσα την φαινολική ωριμότητα των σταφυλιών των ερυθρών ποικιλιών (Saint-Cricq de Gaulejac, *et al.*, 1998). Στο Διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι ο κλώνος AG47 και ο κλώνος J19 είχαν καλύτερη φαινολική ωρίμανση για τις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο αντίστοιχα. Η έλλειψη φαινολικής ωρίμανσης κατά τον τρύγο, πιθανών, δικαιολογεί τη μικρότερη συγκέντρωση εκχυλίσιμων ανθοκυανών που παρουσίασε ο κλώνος AG40 (Διάγραμμα 7). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ο κλώνος J19 εμφάνισε τρεις φορές μικρότερη τιμή του δείκτη, εν συγκρίσει με τον κλώνο J30, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε ευκολότερη αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων των ραγών του συγκεκριμένου κλώνου.



Διάγραμμα 9 Συγκέντρωση ταννινών φλοιών και γιγάρτων σε γραμμάρια ανά λίτρο γλεύκου (μέθοδος Glories). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 9 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις ταννινών φλοιών και γιγάρτων. Παρατηρείται ότι οι κλώνοι AG40 και J19 εμφάνισαν υψηλότερη συγκέντρωση ταννινών φλοιών, όπως και ολικών ανθοκυανών ( Διάγραμμα 7), καθώς η εκχύλιση ταννινών και ανθοκυανών από τους φλοιούς πραγματοποιείται ταυτόχρονα (Gonzalez-Neves, *et al.*,2004). Ως προς τις ταννίνες των γιγάρτων, με στατιστικά σημαντική διαφορά, οι υψηλότερες τιμές απαντώνται στους κλώνους AG40 και J19, για την κάθε ποικιλία.





Διάγραμμα 10 Ταννίνες φλοιών και γιγάρτων ως προς το συνολικό φαινολικό φορτίο σε επί τοις εκατό αναλογία (μέθοδος Glories). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

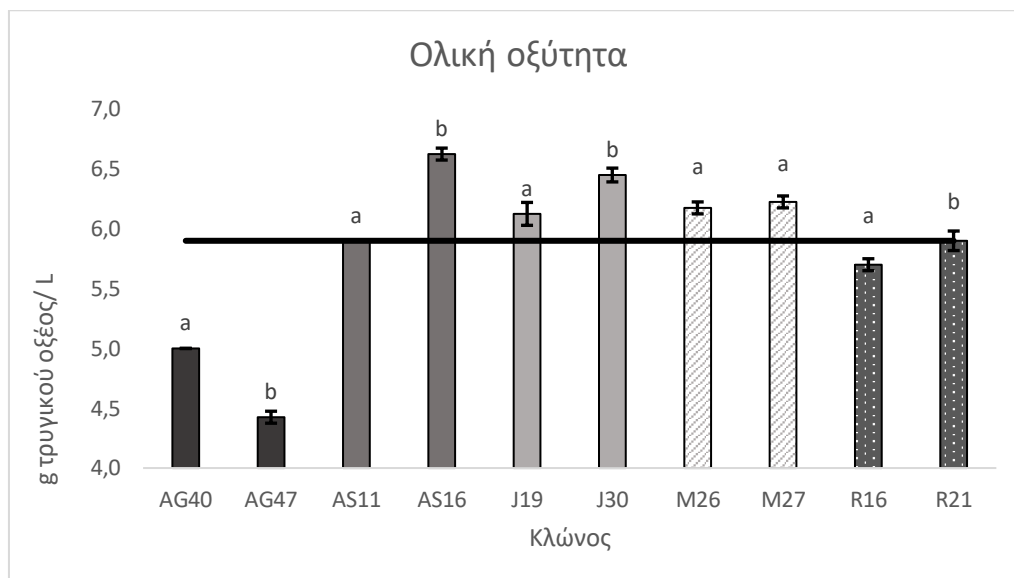
Στο Διάγραμμα 10, παρατίθενται οι επί τοις εκατό ποσοστιαίες αναλογίες των ταννινών των φλοιών και των γιγάρτων ως προς το συνολικό φαινολικό φορτίο. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται και για τα δύο ποσοστά, μόνο μεταξύ των κλώνων της ποικιλίας Αγιωργίτικο, με τον κλώνο AG47 να εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής στις ταννίνες των φλοιών και τον κλώνο AG40 μεγαλύτερο ποσοστό συμμετοχής στις ταννίνες των γιγάρτων. Η ποσοστιαία αναλογία των ταννινών των γιγάρτων σχετίζεται άμεσα με την φαινολική ωρίμανση των σταφυλών, καθώς η σχέση μεταξύ ταννινών φλοιών και γιγάρτων παρουσιάζει μεγάλες διαφορές κατά την πορεία ωρίμανσης, οι οποίες εξομαλύνονται όσο ωριμάζουν οι ράγες.

## 3.2 Αποτελέσματα αναλύσεων στους οίνους

### 3.2.1 Κλασσικές αναλύσεις

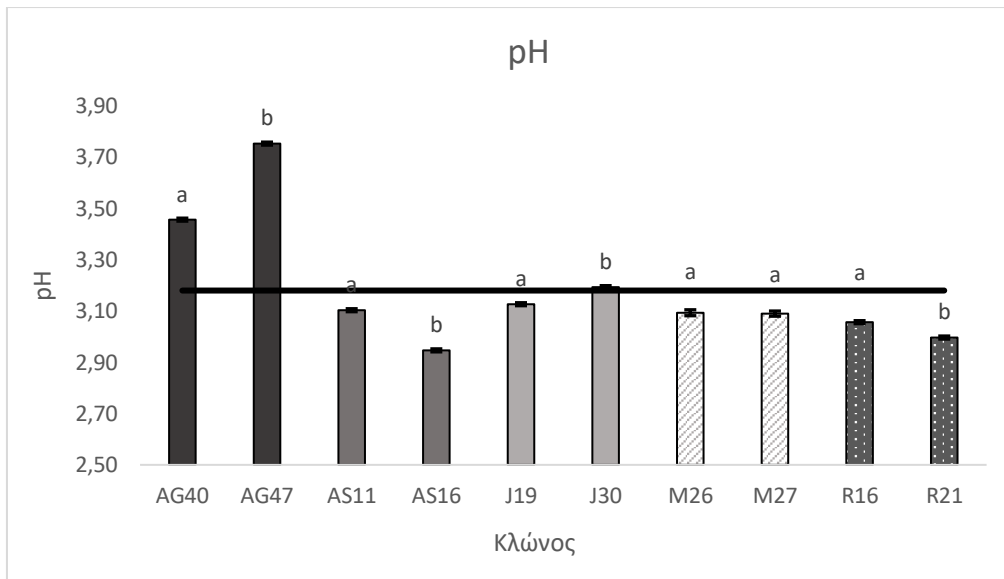
Τα αποτελέσματα όλων των κλασσικών αναλύσεων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα IV του Παραρτήματος.

### 3.2.1.1 Ολική και ενεργός οξύτητα (pH)



Διάγραμμα 11 Ολική οξύτητα των οίνων σε γραμμάρια τρυγικού οξέος ανά λίτρο οίνου. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

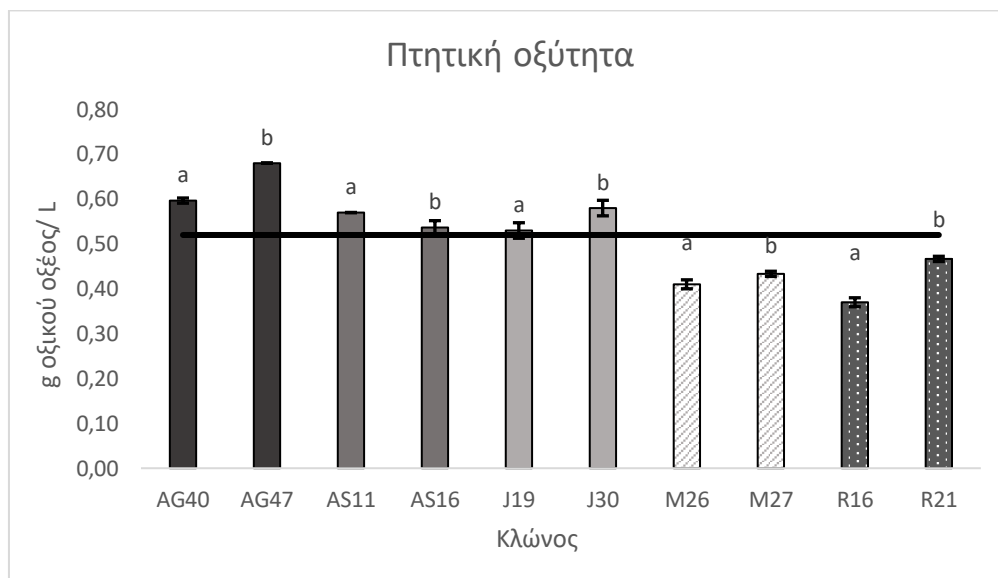
Στο Διάγραμμα 11 παρουσιάζονται οι ολικές οξύτητες των παραχθέντων οίνων. Οι κλώνοι AG40, AS16, J30 και R21 εμφάνισαν υψηλότερες τιμές με στατιστικά σημαντική διαφορά ενώ οι δύο υπό μελέτη κλώνοι της ποικιλίας Μοσχοφίλερο δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Ιδιαίτερα χαμηλές τιμές παρατηρήθηκαν και στους δύο κλώνους της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Χαμηλές εμφανίστηκαν και οι τιμές των κλώνων της ποικιλίας Ασύρτικο.



Διάγραμμα 12 Ενεργός οξύτητα των οίνων (pH). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 12 απεικονίζονται οι τιμές του pH των παραχθέντων οίνων. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των κλώνων όλων των ποικιλιών εκτός των κλώνων της ποικιλίας Μοσχοφίλερο. Τα αποτελέσματα είναι αντιστρόφως ανάλογα αυτών της ολικής οξύτητας (Διάγραμμα 11). Έτσι, οι κλώνοι που σημείωσαν τις υψηλότερες τιμές για κάθε ποικιλία ήταν οι AG47, AS11, J30 και R16. Χαμηλότερες τιμές pH εξασφαλίζουν μεγαλύτερη μικροβιακή σταθερότητα στους οίνους. Επιπλέον, στους ερυθρούς οίνους χαμηλότερες τιμές pH οδηγούν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση μορφών έγχρωμων ανθοκυανών (κατιόν φλαβυλίου).

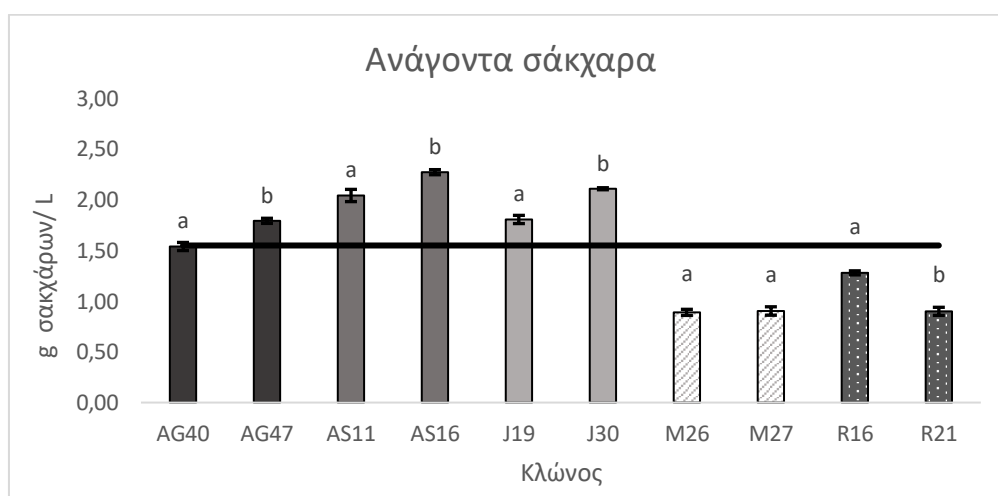
### 3.2.1.2 Πτητική οξύτητα



Διάγραμμα 13 Πτητική οξύτητα των παραχθέντων οίνων σε γραμμάρια οξικού οξέος ανά λίτρο οίνου. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 13 αποτυπώνονται οι συγκεντρώσεις της πτητικής οξύτητας των οίνων. Όλοι οι οίνοι παρουσίασαν συγκεντρώσεις εντός νομοθετικών ορίων (<1,1 g/L για λευκούς οίνους και <1,2 για ερυθρούς οίνους). Οι μικρότερες συγκεντρώσεις απαντώνται στους κλώνους AG40, AS16, J19, M26 και R16, με στατιστικά σημαντική διαφορά από τον άλλο υπό μελέτη κλώνο της κάθε ποικιλίας.

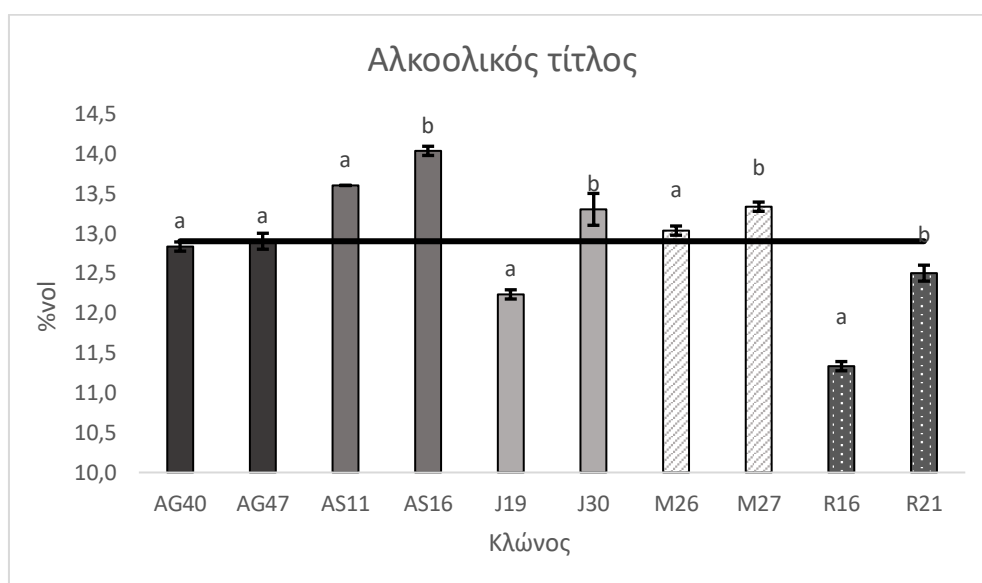
### 3.2.1.3 Ανάγοντα σάκχαρα



Διάγραμμα 14 Ανάγοντα σάκχαρα των παραχθέντων οίνων σε γραμμάρια ανά λίτρο οίνου. . Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις αναγόντων σακχάρων ανά λίτρο οίνου. Όλοι οι οίνοι χαρακτηρίζονται ως ξηροί, σύμφωνα με τη νομοθεσία (<4 g/L). Όλοι οι κλώνοι των ποικιλιών, με εξαίρεση αυτών της ποικιλίας Μοσχοφίλερο, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τις υψηλότερες τιμές να εμφανίζονται στους κλώνους AG47, AS16, J30 και R16 για την κάθε ποικιλία.

### 3.2.1.4 Αλκοολικός τίτλος



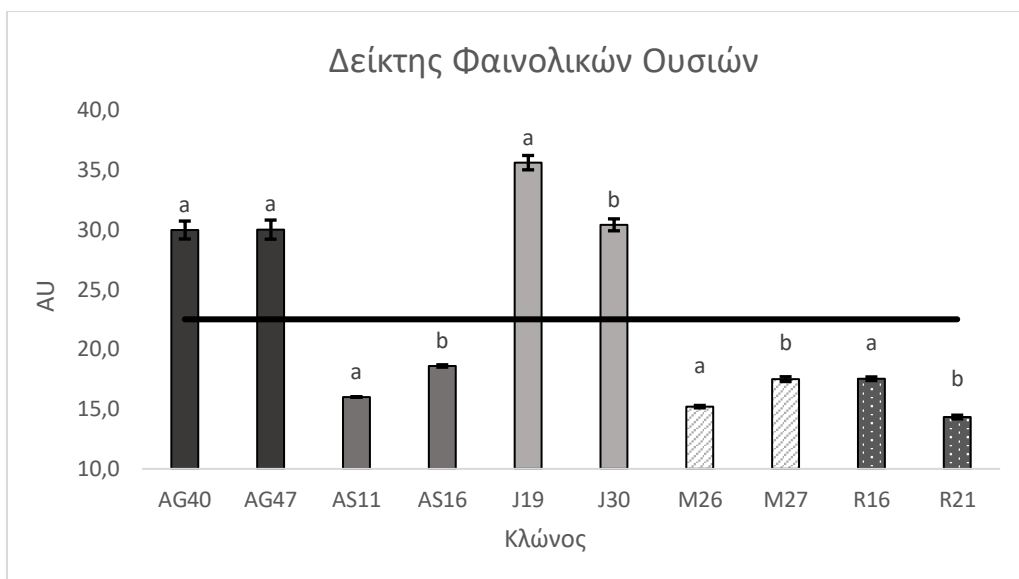
Διάγραμμα 15 Αλκοολικός τίτλος σε επί τοις εκατό αιθανόλη κατ' όγκο. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 15 παρουσιάζεται ο αλκοολικό τίτλος των παραχθέντων οίνων. Οι κλώνοι της ποικιλίας Αγιωργίτικο ήταν οι μόνοι που δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τις υψηλότερες τιμές για κάθε ποικιλία εμφάνισαν οι κλώνοι AS16, J30, M27 και R21. Οι διαφορές του αλκοολικού τίτλου μεταξύ των κλώνων των ποικιλιών οφείλονται σε διαφορετική σακχαροπεριεκτικότητα των σταφυλών κατά τον τρυγητό, άρα οι κλώνοι με τον υψηλότερο αλκοολικό τίτλο ωρίμασαν πιο γρήγορα.

## 3.2.2 Φαινολικά συστατικά και ταννίνες

### 3.2.2.1 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ)

Τα αποτελέσματα του Δείκτη Φαινολικών Ουσιών παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα V του Παραρτήματος

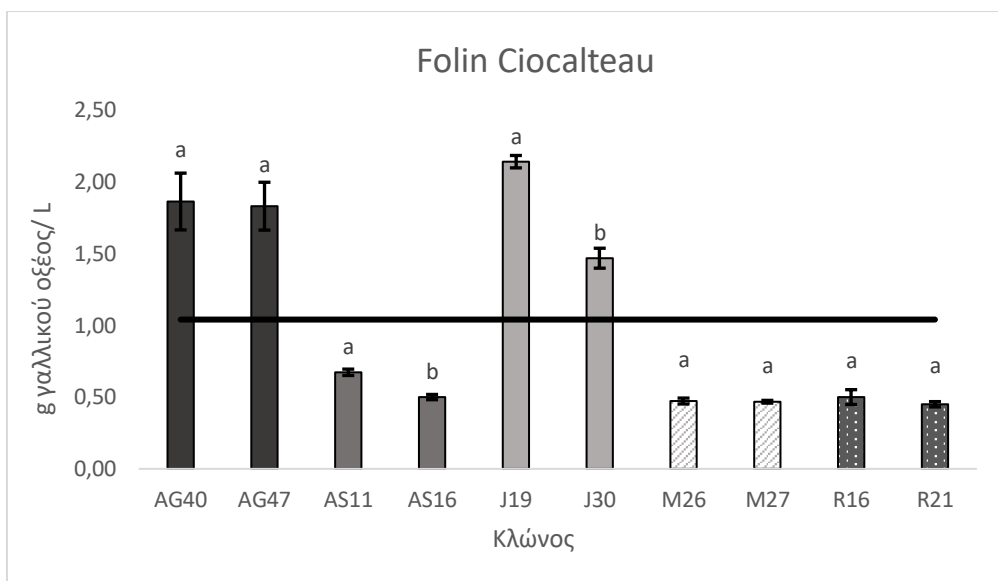


Διάγραμμα 16 Δείκτης Φαινολικών Ουσιών στους παραχθέντες οίνους. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 16 παρουσιάζεται ο Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) των οίνων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται μεταξύ των κλώνων όλων των ποικιλιών, πλην αυτών του Αγιωργίτικου. Οι υψηλότερες τιμές σημειώθηκαν στους AS16, J19, M27 και R16. Παρατηρούμε ότι ενώ οι κλώνοι της ποικιλίας Ξινόμαυρο δεν εμφάνιζαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τα φαινολικά συστατικά ανά γραμμάριο ράγας (Διάγραμμα 6), ο κλώνος J19 εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών στον οίνο. Αυτό, πιθανόν, εξηγείται από την ικανότητα εκχύλισης των φαινολικών από τις ράγες στους οίνους.

### 3.2.2.2 Ολικά Φαινολικά (Folin Ciocalteu)

Τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα VI του Παραρτήματος.



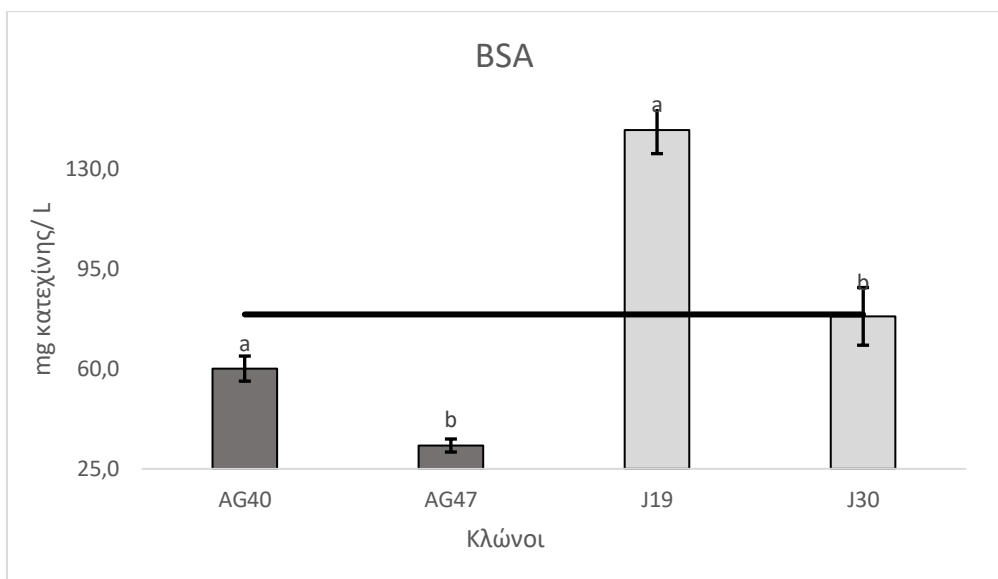
Διάγραμμα 17 Ολικά φαινολικά συστατικά στους παραχθέντες οίνους (Folin Ciocalteu). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 17 απεικονίζονται τα ολικά φαινολικά συστατικά των οίνων, με τη μέθοδο Folin Ciocalteu. Παρατηρούμε ότι με τη συγκεκριμένη μέθοδο, μόνο οι κλώνοι των ποικιλιών Ασύρτικο και Ξινόμαυρο εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τους κλώνους AS11 και J19 να σημειώνουν τις υψηλότερες τιμές, για την κάθε ποικιλία αντίστοιχα. Η μέθοδος του ΔΦΟ και η Folin Ciocalteu παρουσιάζουν διαφορές στα αποτελέσματά τους. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε ενώσεις όπως τα κινναμωμικά οξέα και οι χαλκόνες, που δεν παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 280nm (μέθοδος ΔΦΟ) και άρα δεν προσμετρώνται από την μέθοδο του ΔΦΟ, ενώ η μέθοδος του Folin-Ciocalteu υπολογίζει και τις συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις.

### 3.2.2.3 Ταννίνες με πρόσδεση από πρωτεΐνες (BSA)

Τα αποτελέσματα συγκέντρωσης των ταννινών με τη μέθοδο Harbertson (BSA) παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα VII του Παραρτήματος



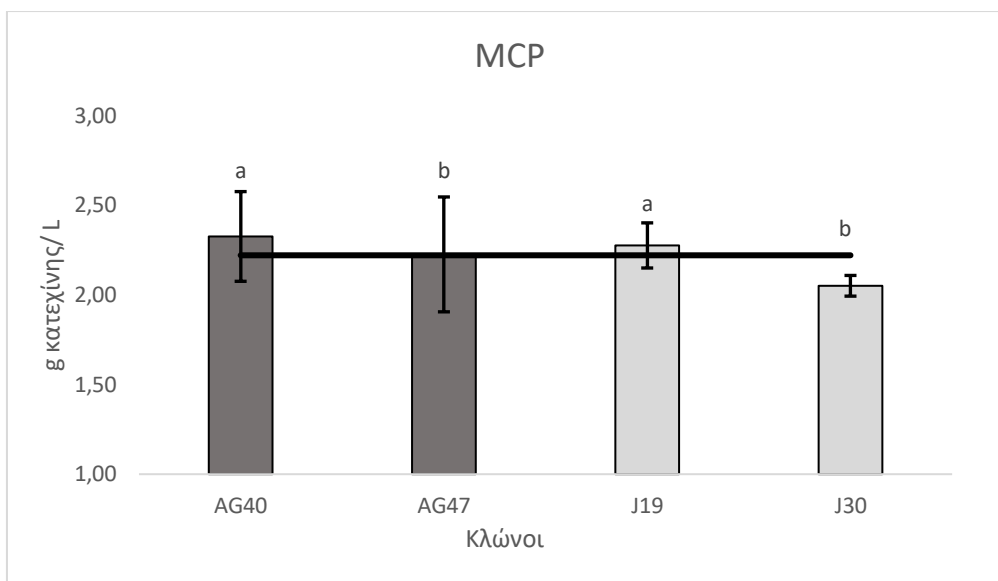


Διάγραμμα 18 Συγκέντρωση ταννινών σε μιλιγραμμάρια κατεχίνης ανά λίτρο οίνου (μέθοδος Harbertson). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 18 αποτυπώνονται οι συγκεντρώσεις κατεχίνης στους οίνους. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφάνισαν οι κλώνοι και των δύο υπό μελέτη ερυθρών ποικιλιών, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να απαντώνται στους κλώνους AG40 και J19. Υψηλά ισχυρή συσχέτιση ( $r= 0.9156$ ,  $p<0.05$ ) παρατηρείται μεταξύ της μεθόδου BSA και του ΔΦΟ (Διάγραμμα 16).

### 3.2.2.4 Ταννίνες με κατακρήμνιση από μέθυλ-κυτταρίνη (MCP)

Τα αποτελέσματα συγκέντρωσης ταννινών με τη μέθοδο Sarneckis (MCP) παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα VIII του Παραρτήματος.



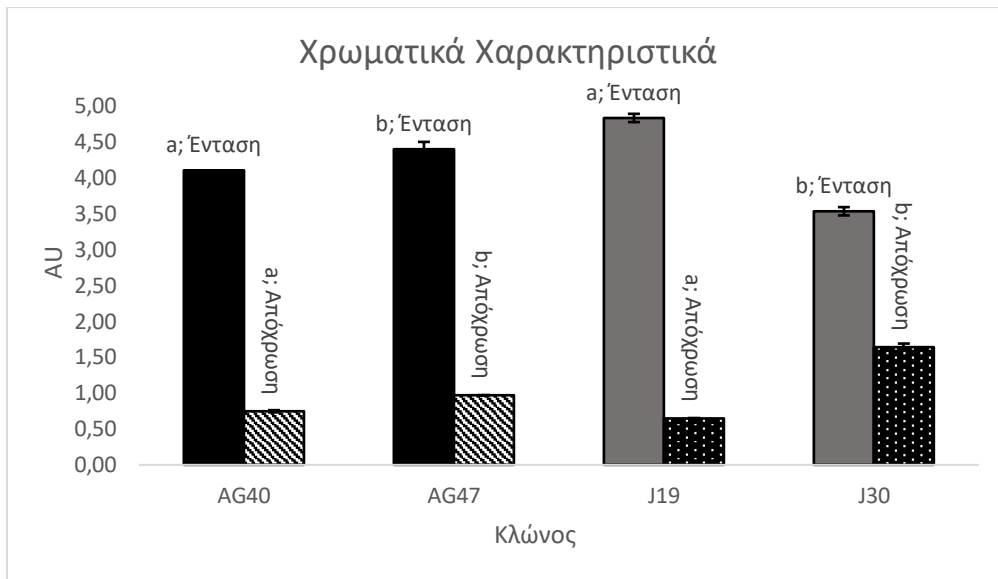
Διάγραμμα 19 Συγκέντρωση ταννινών σε γραμμάρια κατεχίνης ανά λίτρο οίνου (μέθοδος Sarneckis). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 19 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις κατεχίνης ανά λίτρο οίνου. Τόσο οι κλώνοι της ποικιλίας Αγιωργίτικο, όσο και οι κλώνοι της ποικιλίας Ξινόμαυρο, εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους με τους κλώνους AG40 και J19 να παρουσιάζουν τις υψηλότερες τιμές για την κάθε ποικιλία, αντίστοιχα. Η διαφορά στην τάξη μεγέθους των συγκεντρώσεων των ταννινών που παρατηρείται μεταξύ των μεθόδων BSA (Διάγραμμα 18) και MCP, οφείλεται στο γεγονός ότι η αλβουμίνη, που χρησιμοποιείται στη μέθοδο BSA, καταβυθίζει κυρίως προανθοκυανιδίνες με βαθμό πολυμερισμού από τέσσερα έως οκτώ, ενώ η MCP ταννίνες με μεγαλύτερο εύρος ως προς το βαθμό πολυμερισμού τους.

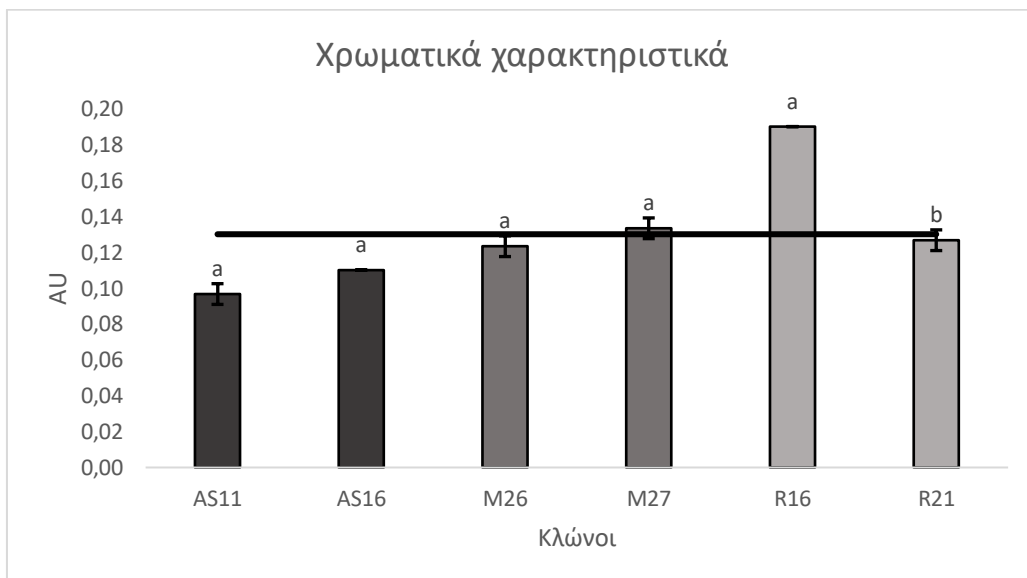
### 3.2.3 Χρωματικά χαρακτηριστικά και ανθοκυάνες

#### 3.2.3.1 Χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση και απόχρωση)

Τα αποτελέσματα των χρωματικών χαρακτηριστικών των οίνων παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα ΙΧ του Παραρτήματος



Διάγραμμα 20 Χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση και απόχρωση) των ερυθρών παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )



Διάγραμμα 21 Χρωματικά χαρακτηριστικά (απορρόφηση στα 420nm) των λευκών παραχθέντων οίνων. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

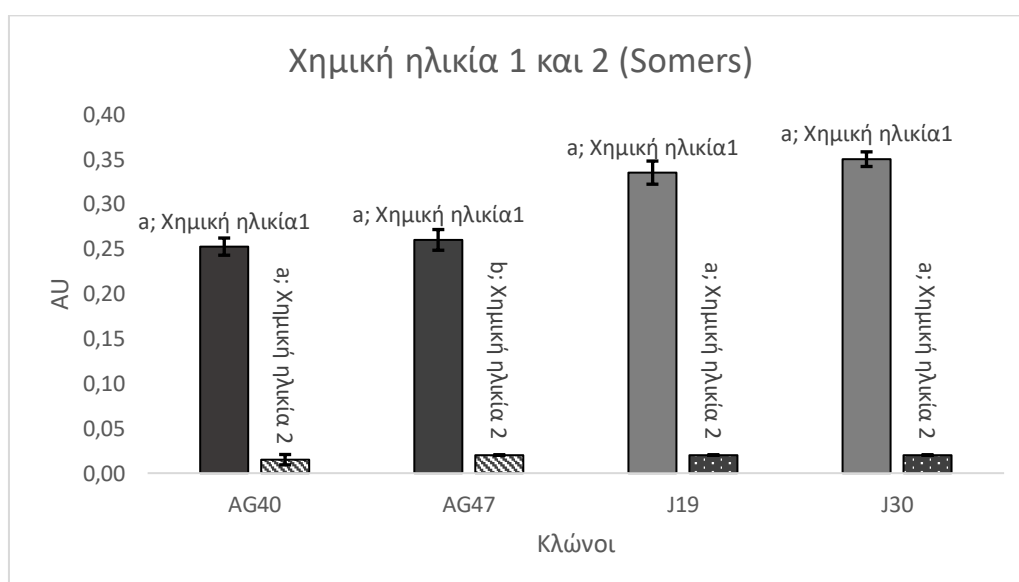
Στα Διαγράμματα 20 και 21 παρουσιάζονται τα χρωματικά χαρακτηριστικά των οίνων (ένταση και απόχρωση). Στην περίπτωση των λευκών οίνων, τα δύο αυτά χαρακτηριστικά ταυτίζονται και αποδίδονται από την απορρόφηση στα 420nm. Στους ερυθρούς οίνους (Διάγραμμα 20) στατιστικά σημαντικές διαφορές σημείωσαν οι κλώνοι, και των δύο υπό μελέτη ποικιλιών, και για τα δύο χαρακτηριστικά. Ο κλώνος AG40 εμφάνισε τη μεγαλύτερη ένταση και απόχρωση, για την ποικιλία Αγιωργίτικο,

ενώ ο κλώνος J19 τη μεγαλύτερη τιμή και για τα δύο χαρακτηριστικά, για την ποικιλία Εινόμαυρο. Οι τιμές της έντασης για όλους τους οίνους, και των δύο ποικιλιών, χαρακτηρίζονται χαμηλές, ενώ υψηλές είναι οι τιμές της απόχρωσης, για φρέσκους οίνους.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των λευκών οίνων, μόνο οι κλώνοι της ποικιλίας Ροδίτη εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τον κλώνο R16 να σημειώνει την υψηλότερη τιμή.

### 3.2.3.2 Χρωματικοί δείκτες Somers

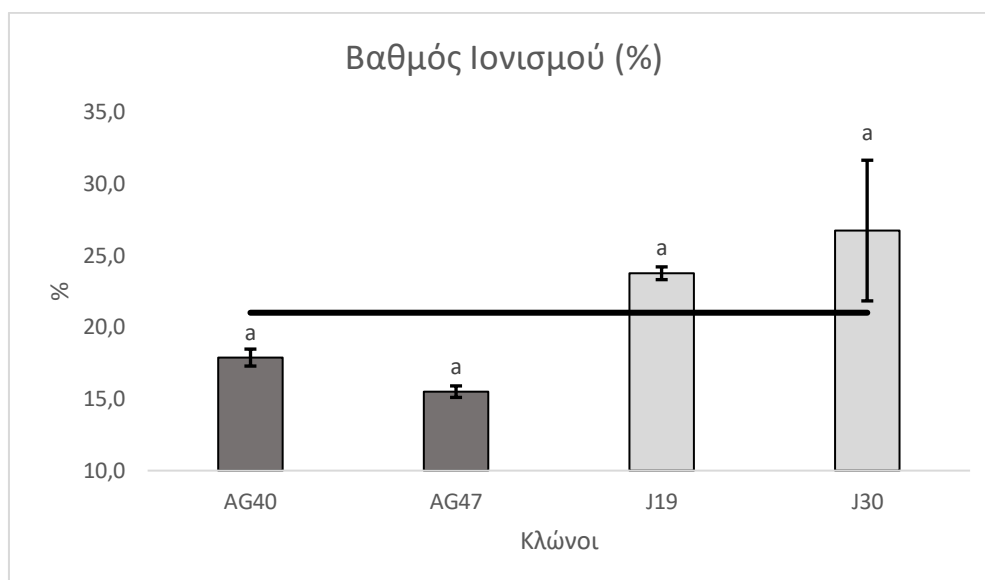
Τα αποτελέσματα των χρωματικών δεικτών με τη μέθοδο Somers παρουσιάζονται αναλυτικά στο Πίνακα X του Παραρτήματος



Διάγραμμα 22 Χημική ηλικία 1 και 2 (μέθοδος Somers). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

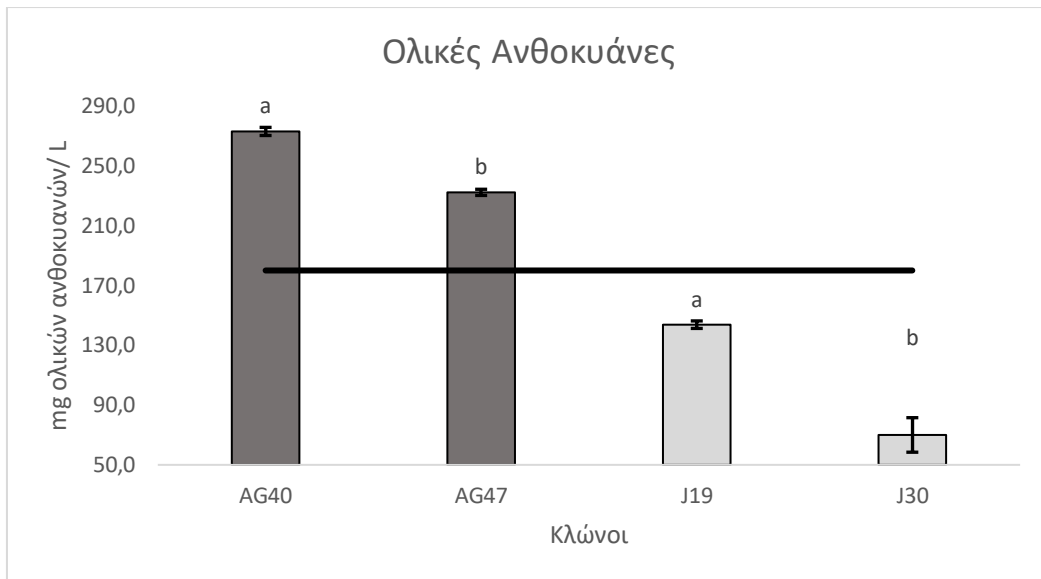
Στο Διάγραμμα 22 παρουσιάζεται η χημική ηλικία των οίνων όπως υπολογίζεται από τους δείκτες της μεθόδου Somers. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφανίζονται μόνο για τον δείκτη Χημική ηλικία δύο, στους κλώνους της ποικιλίας Αγιωργίτικο. Τα μεγέθη των Χημικών ηλικιών 1 και 2, δεν έχουν ιδιαίτερο φυσικό ενδιαφέρον για νεαρούς ερυθρούς οίνους, καθώς πρόκειται για μια αναλογία που αυξάνεται στην πορεία του χρόνου και έχει ως στόχο να περιγράψει τον ρυθμό παλαίωσης ενός οίνου, καθώς οι μονομερείς ανθοκυάνες αντικαθίστανται από τα πολυμερισμένα σύμπλοκα.

Ωστόσο, όσον αφορά τη Χημική ηλικία 1 οι νεαροί ερυθροί οίνοι κινούνται σε ένα εύρος τιμών μεταξύ 0,1 με 0,5, εντός του οποίου βρίσκονται όλα τα δείγματα. Η Χημική ηλικία 2 κινείται σε ένα εύρος τιμών από 0,02 έως 0,2, εντός των οποίων εμφανίζονται και τα παρόντα δείγματα.



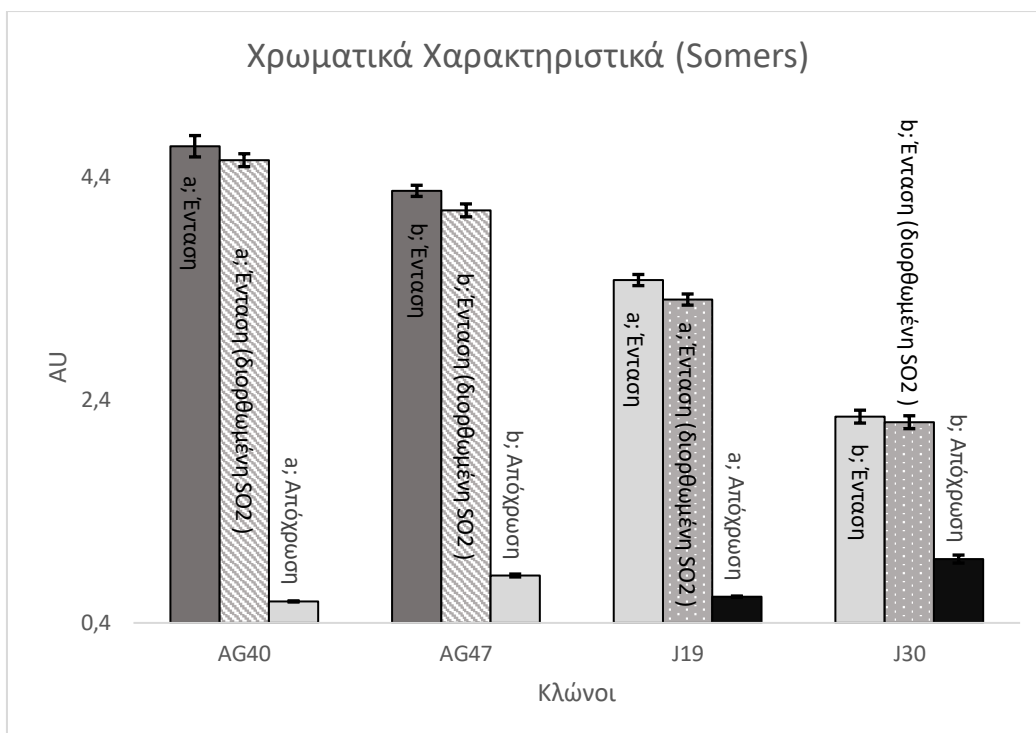
Διάγραμμα 23 Ποσοστό βαθμού ιονισμού των ανθοκυανών (μέθοδος Somers). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 23 παρουσιάζεται το ποσοστό βαθμού ιονισμού των ανθοκυανών όπως υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου Somers. Οι κλώνοι και των δύο ποικιλιών, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Ο βαθμός ιονισμού αντικατοπτρίζει την αναλογία ολικών ανθοκυανών ως προς τις έγχρωμες μορφές αυτών.



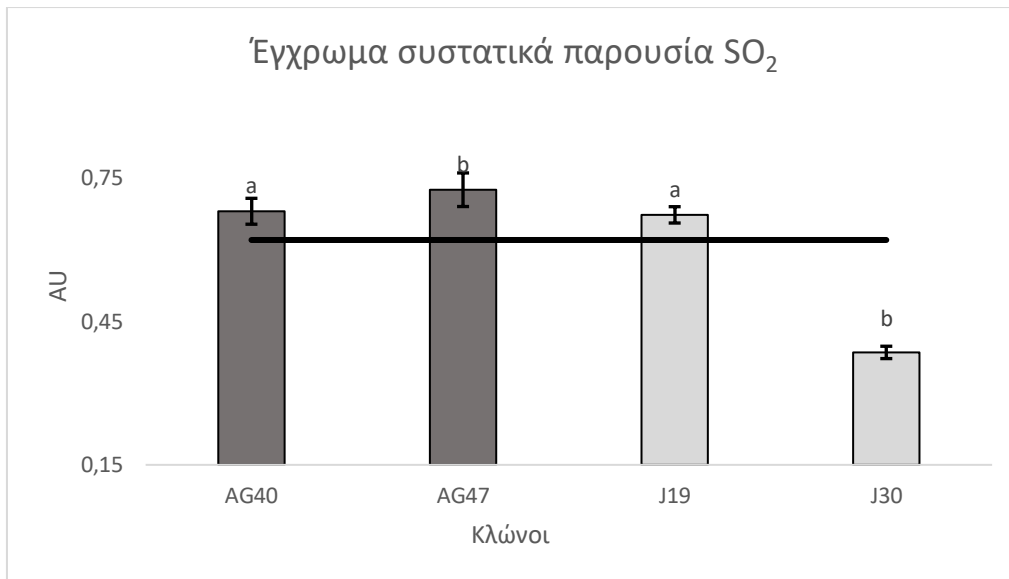
Διάγραμμα 24 Ολικές ανθοκυάνες σε μιλιγραμμάρια ανά λίτρο οίνου (μέθοδος Somers). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Στο Διάγραμμα 24 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των ολικών ανθοκυανών των οίνων όπως υπολογίσθηκαν με τη μέθοδο Somers. Οι κλώνοι AG40 και J19, εμφάνισαν με στατιστικά σημαντική διαφορά, τις υψηλότερες συγκεντρώσεις για την κάθε ποικιλία.



Διάγραμμα 25 Χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση, απόχρωση και ένταση διορθωμένη ως προς SO<sub>2</sub>) (μέθοδος Somers). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Το Διάγραμμα 25 απεικονίζει τα χρωματικά χαρακτηριστικά, όπως υπολογίσθηκαν με τη χρήση δεικτών της μεθόδου Somers. Η ένταση και η απόχρωση παρουσιάζουν διαφορές ως προς τις τιμές του Διαγράμματος 20, καθώς με τη μέθοδο Somers δε λαμβάνεται υπόψιν η απορρόφηση στα 620nm όσον αφορά τον υπολογισμό της έντασης και όσον αφορά την απόχρωση των οίνων, η αραιώση του δείγματος με την παρούσα μέθοδο, πραγματοποιείται με model wine. Υψηλότερη ένταση, παρουσίασαν οι κλώνοι AG40 και J19, ενώ υψηλότερη απόχρωση οι κλώνοι AG47 και J30, με στατιστικά σημαντική διαφορά. Την υψηλότερη ένταση, διορθωμένη ως προς SO<sub>2</sub>, εμφάνισαν οι κλώνοι που παρουσίασαν και τη μεγαλύτερη ένταση, δηλαδή οι κλώνοι AG40 και J19.



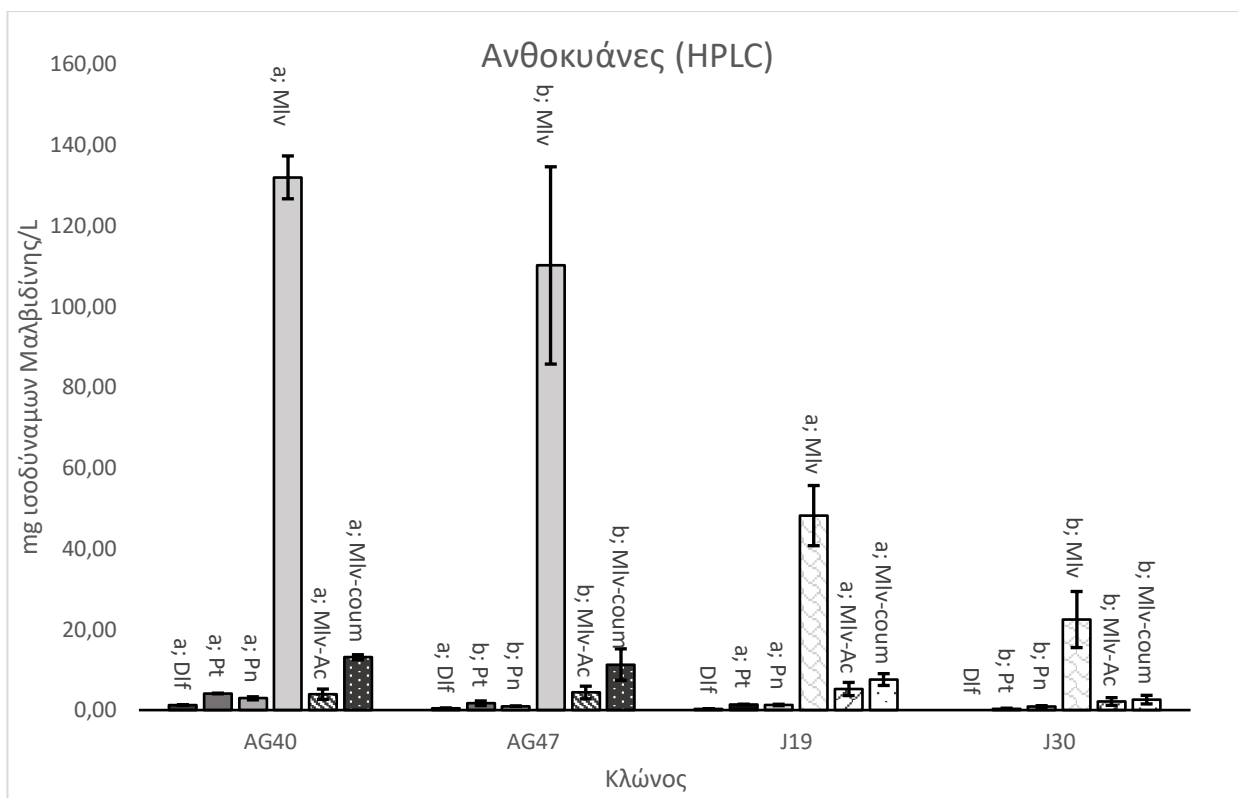
Διάγραμμα 26 Έγχρωμα συστατικά παρουσία SO<sub>2</sub> στους οίνους (μέθοδος Somers). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ )

Τις υψηλότερες τιμές του δείκτη έγχρωμα συστατικά παρουσία SO<sub>2</sub>, που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 26, εμφάνισαν οι κλώνοι AG47 και J19, για τις ποικιλίες Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο, αντίστοιχα. Ισχυρά θετική συσχέτιση ( $r=0.8125$ ,  $p<0.05$ ), εμφάνισε το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό με τις ολικές ανθοκυάνες. Το γεγονός αυτό είναι απόλυτα κατανοητό καθώς, οι ανθοκυάνες που βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους είναι αυτές που είναι ευαίσθητες στον αποχρωματισμό με την προσθήκη SO<sub>2</sub>, αρχή στην οποία βασίζεται και η μέθοδος προσδιορισμού των ολικών ανθοκυανών.

### 3.2.3.3 Ανθοκυάνες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των ανθοκυανών με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα XI του Παραρτήματος.



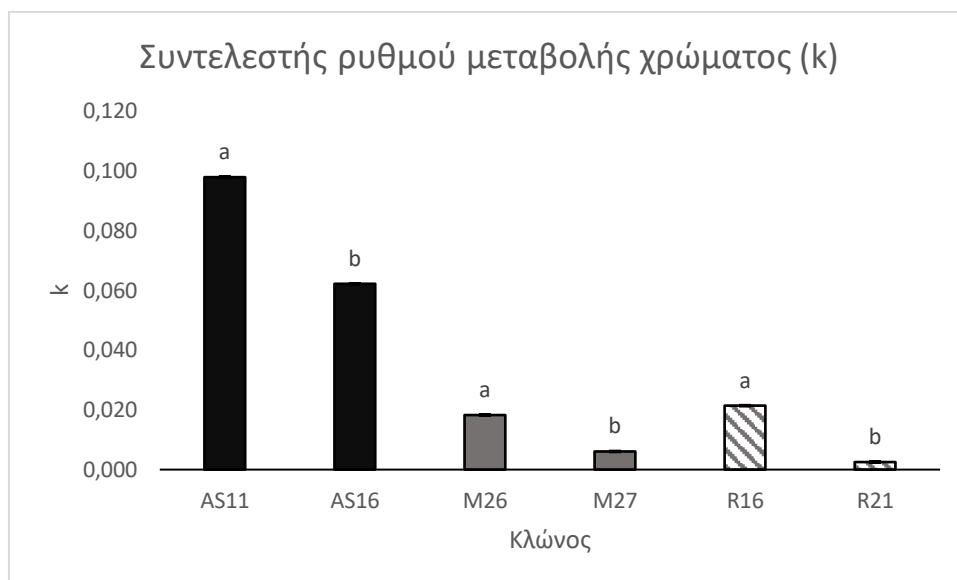


Διάγραμμα 27 Συγκέντρωση ανθοκυανών σε μιλιγραμμάρια ισοδύναμων μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου (HPLC). Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ ). Στις ετικέτες: Dlf, 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης, Pt, 3-O-μονογλυκοζίτης της πετουινιδίνης, Pn, 3-O-μονογλυκοζίτη της της πεονιδίνης; Mln, 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης, Mln-ac, οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης, Mln-coum, κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης.

Στο Διάγραμμα 27 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ανθοκυανών σε ισοδύναμα μαλβιδίνης ανά λίτρο οίνου, όπως υπολογίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Παρατηρείται ότι, η κυρίαρχη ανθοκυάνη σε όλους τους οίνους ήταν ο 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mln) με την υψηλότερη συγκέντρωση αυτού να απαντάται στους κλώνους AG40 και J19. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των εστεροποιημένων μορφών της Mln, και συγκεκριμένα ο κουμαρικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτης της μαλβιδίνης (Mln-coum) και εν συνεχεία ο οξικός εστέρας του 3-O-μονογλυκοζίτη της μαλβιδίνης (Mln-Ac), για τις οποίες οι κλώνοι δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η συνεισφορά της Mln για τον AG40 ως προς το σύνολο των ανθοκυανών ήταν 83.9% ενώ για τον J19 75.5%, ενώ οι εστεροποιημένες μορφές της Mln (Mln-coum και Mln-Ac) συμμετείχαν ως προς το σύνολο των ανθοκυανών σε ποσοστό 10.8% για τον AG40 και σε ποσοστό 19.8% για τον J19. Στον κλώνο J30, της ποικιλίας Ξινόμαυρο, δεν ανιχνεύθηκε ο 3-O-μονογλυκοζίτης της δελφινιδίνης (Dlf)

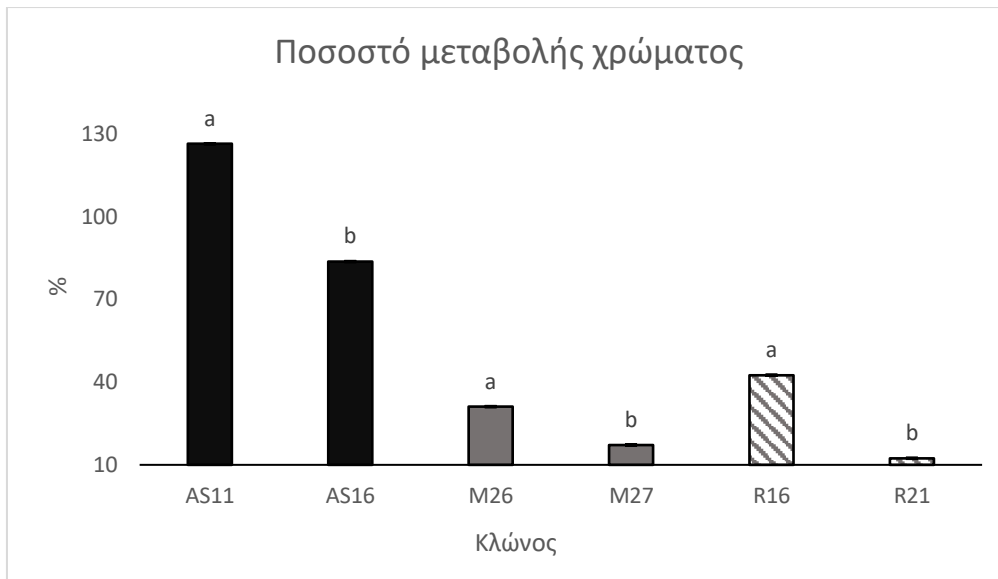
### 3.2.4 Τεστ ταχείας αμαύρωσης

Τα αποτελέσματα τους τεστ ταχείας αμαύρωσης παρουσιάζονται αναλυτικά στο Πίνακα XII του Παραρτήματος.



Διάγραμμα 28 Συντελεστής ρυθμού μεταβολής χρώματος (k) για τους λευκούς παραχθέντες οίνους. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ ).

Στο Διάγραμμα 29 παρουσιάζεται ο συντελεστής ρυθμού μεταβολής του χρώματος (k) των λευκών οίνων. Στατιστικά σημαντικές διαφορές εμφάνισαν οι κλώνοι όλων των οίνων, με τις υψηλότερες τιμές να σημειώνονται στους κλώνους AS11, M26 και R16, δείχνοντας έτσι ότι οι οίνοι αυτοί έχουν την τάση να οξειδωθούν ταχύτερα εν συγκρίσει με τους οίνους που παράχθηκαν από τον έτερο κλώνο της κάθε ποικιλίας.



*Διάγραμμα 29 Ποσοστό μεταβολής χρώματος των λευκών οίνων. Οι μπάρες δείχνουν την  $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου των τιμών. Τιμές με διαφορετικά γράμματα ανάμεσα στους κλώνους της κάθε ποικιλίας διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Students' test,  $p < 0.05$ ).*

Στο Διάγραμμα 30 παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή του χρώματος των οίνων στη διάρκεια του 12ήμερου τεστ επιταχυνόμενης οξείδωσης. Οι κλώνοι έδωσαν ανάλογα αποτελέσματα με αυτά του ρυθμού μεταβολής χρώματος (Διάγραμμα 29) με τους κλώνους AS11, M26 και R16 να σημειώνουν να μεγαλύτερα ποσοστά μεταβολής, υποδεικνύοντας ότι οι συγκεκριμένοι οίνοι εμφάνισαν τη μεγαλύτερη οξείδωση, κατά τη διάρκεια του τεστ.

## Κεφάλαιο 4: Συζήτηση- Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση και η σύγκριση των ποιοτικών χαρακτηριστικών οίνων που προέρχονται από διαφορετικούς κλώνους, πέντε βασικών ελληνικών ποικιλιών: Ασύρτικο, Μοσχοφίλερο, Ροδίτη, Αγιωργίτικο και Ξινόμαυρο. Ως κλωνική επιλογή καθορίζεται η επιλογή γονοτύπων εντός μιας συγκεκριμένης ποικιλίας αμπέλου (*Vitis L.*) με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως αυτά ορίζονται από τους στόχους της διαδικασίας επιλογής, με απώτερο σκοπό την παραγωγή οίνων υψηλής ποιότητας. Για κάθε ποικιλία μελετήθηκαν δύο κλώνοι, στους οποίους πραγματοποιήθηκαν διπλές μικροοινοποιήσεις ώστε να αναλυθούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των οίνων που προήλθαν από κάθε κλώνο. Παράλληλα, αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν και στις σταφυλές του κάθε κλώνου, με στόχο να συσχετιστούν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των ραγών και των οίνων.

Η διερεύνηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των συγκεκριμένων κλώνων, πραγματοποιείται για δεύτερη χρονιά, δίνοντάς μας έτσι τη δυνατότητα, να έχουμε σε ένα βαθμό, πιο ασφαλή ενδείξεις, σχετικά με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά, κρίνεται αναγκαίο η συγκεκριμένη μελέτη να επαναληφθεί και τις επόμενες χρονιές.

Για την ποικιλία Ασύρτικο, οι κλώνοι που μελετήθηκαν ήταν ο E11 (AS11) και ο κλώνος 16 (AS16). Ο κλώνος E11 είχε υψηλότερη συγκέντρωση οργανικού αζώτου στις ράγες (α-αμινοξέων) που συνδέεται με τη δευτερογενή παραγωγή πτητικών συστατικών. Παρόλα αυτά, στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, δεν πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τη πτητικά συστατικά των οίνων, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο η διαφορά αυτή επηρέασε την αρωματική παλέτα των οίνων. Όσον αφορά τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στους οίνους, ο οίνος που προήλθε από τον κλώνο 16, εμφάνισε καλύτερα χαρακτηριστικά εν συγκρίσει με τον οίνο που προήλθε από τον E11. Συγκεκριμένα, ο οίνος του E11 εμφάνισε μικρότερο pH και μεγαλύτερη ολική οξύτητα. Οι χαμηλότερες τιμές pH διασφαλίζουν μεγαλύτερη μικροβιακή σταθερότητα στους οίνους, ενώ στους λευκούς οίνους, υψηλότερες τιμές οξύτητας οδηγούν σε πιο ισορροπημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ο οίνος του E16, επιπλέον, εμφάνισε υψηλότερες τιμές ως προς τα φαινολικά συστατικά του,

γεγονός, που πιθανώς συνδέεται με το μικρότερο ρυθμό και τη μικρότερη ποσοστιαία μεταβολή χρώματος που παρατηρήθηκε μέσω του τεστ ταχείας αμαύρωσης. Μικρότερη τάση οξειδωσης εμφάνισε και κατά την προηγούμενη χρονιά ο οίνος που προήλθε από το συγκεκριμένο κλώνο. Τέλος, ο κλώνος E16 εμφάνισε υψηλότερο αλκοολικό τίτλο, που οφείλεται σε μεγαλύτερη σακχαροπεριεκτικότητα κατά τον τρύγο, υποδεικνύοντας ταχύτερη ωρίμανση σε σύγκριση με τον κλώνο E11.

Για την ποικιλία Μοσχοφίλερο, μελετήθηκαν οι κλώνοι E26 (M26) και E27 (M27). Οι σταφυλές του κλώνου E26 ήταν αυτές που παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση τόσο οργανικού όσο και ολικού αφομοιώσιμου αζώτου. Ως προς τα χαρακτηριστικά των παραχθέντων οίνων, οι οίνοι των δύο κλώνων δεν παρουσίασαν διαφορές στην ενεργό και ολική οξύτητα, παρουσιάζουν όμως διαφορές ως προς το φαινολικό τους φορτίο, με τον οίνο του κλώνου E27 να εμφανίζει υψηλότερο δείκτη φαινολικών ουσιών (ΔΦΟ). Το υψηλότερο φαινολικό φορτίο του οίνου του E27, αποτυπώθηκε και στα αποτελέσματα του τεστ ταχείας αμαύρωσης, στο οποίο σημείωσε μικρότερο ρυθμό μεταβολής χρώματος άρα και μικρότερη τάση για οξειδωση εν συγκρίσει με τον οίνο του ετέρου κλώνου. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι εν αντιθέσει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ο συγκεκριμένος οίνος την προηγούμενη χρονιά ήταν αυτός που παρουσίασε τη μεγαλύτερη τάση για οξειδωση. Τέλος, η διαφορά στον αλκοολικό τίτλο των δύο οίνων οφείλεται σε ταχύτερη ωρίμανση του κλώνου E27.

Οι κλώνοι που μελετήθηκαν για την ποικιλία Ροδίτη ήταν οι 25-E16 (R16) και 02-E1-E21 (R21). Οι ράγες του 25-E16 ήταν αυτές που εμφάνισαν την υψηλότερη συγκέντρωση αμμωνιακού και οργανικού αζώτου. Ο οίνος του 02-E1-E21 εμφάνισε μικρότερο pH και μεγαλύτερη ολική οξύτητα, όπως και στη συγκριτική μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί κατά την προηγούμενη χρονιά. Ως προς τα φαινολικά συστατικά, ο οίνος του κλώνου 02-E1-E21 ενώ παρουσίασε χαμηλότερη τιμή ΔΦΟ, ήταν αυτός που είχε τη μικρότερη τάση για οξειδωση, σύμφωνα με το ρυθμό και την ποσοστιαία μεταβολή χρώματος. Τα αποτελέσματα του οίνου 02-E1-E21 ως προς το τεστ ταχείας αμαύρωσης έρχονται σε συμφωνία με αυτά της μελέτης που πραγματοποιήθηκε την προηγούμενη χρονιά.

Στην ποικιλία Αγιωργίτικο οι υπό μελέτη κλώνοι ήταν ο 03-E40 (AG40) και ο 41-E47 (AG47). Ο κλώνος 41-E47 έδωσε σταφυλές με υψηλότερη συγκέντρωση τόσο αμμωνιακού όσο και οργανικού αζώτου. Επιπλέον, οι ράγες του συγκεκριμένου

κλώνου εμφάνισαν μικρότερο βάρος ανά ράγα, το οποίο αποτυπώθηκε και στη συγκέντρωση ανθοκυανών και φαινολικών ουσιών ανά γραμμάριο ράγας. Ο δείκτης εκχυλισσιμότητας ανθοκυανών (AE%) υπέδειξε ότι το μικρότερο μέγεθος ραγών που εμφάνισαν οι σταφυλές του συγκεκριμένου κλώνου, οδήγησε σε μεγαλύτερη ευχέρεια εκχύλισης ανθοκυανών, πιθανών λόγω μεγαλύτερης αναλογίας φλοιού προς σάρκα. Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών και της περιεκτικότητας ταννινών και φαινολικού δυναμικού των ραγών του κλώνου 41-E47 της παρούσας μελέτης, έρχονται σε συμφωνία με αυτά της προηγούμενης συγκριτικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε την προηγούμενη χρονιά. Τα αποτελέσματα των σταφυλών του κλώνου 41-E47, αποτυπώνονται και στους παραχθέντες οίνους, καθώς οι οίνος που προήλθε από τον συγκεκριμένο κλώνο εμφάνισε υψηλότερη χρωματική ένταση και μεγαλύτερη τιμή ως προς τα έγχρωμα συστατικά παρουσία θειώδους, εν συγκρίσει με τον οίνο του κλώνου 03-E40. Ως προς τα φαινολικά συστατικά, ο οίνος του 41-E47, σημείωσε χαμηλότερη συγκέντρωση και με τη μέθοδο Harbertson (BSA) και με τη μέθοδο Sarnieckis (MCP). Η μέθοδος BSA λόγω της κατακρήμνισης προανθοκυανιδών μοριακού βάρους 4 έως 8, καλείται και δείκτης στυπτικότητας. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων, ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο τα αποτελέσματα των αναλύσεων αποτυπώνονται και στο οργανοληπτικό προφίλ των οίνων. Κατά την περσινή διεξαγωγή της μελέτης ο οίνος του κλώνου 03-E40 ήταν αυτός που εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση κατεχίνης τόσο με τη μέθοδο BSA όσο και με τη μέθοδο MCP, γεγονός που αποτυπώνεται και στα δεδομένα της φετινής μελέτης.

Για την ποικιλία Ξινόμαυρο, οι υπό μελέτη κλώνοι ήταν ο 19 (J19) και ο E2-E30 (J30). Όσον αφορά το αφομοιώσιμο άζωτο, οι ράγες του κλώνου E2-E30 σημείωσαν υψηλότερη συγκέντρωση τόσο αμμωνιακού όσο και οργανικού αζώτου. Μικρότερο βάρος ανά ράγα και υψηλότερη τιμή ανθοκυανών ανά μιλιγραμμάριο ράγας, εμφάνισαν οι σταφυλές του κλώνου 19. Ο κλώνος 19, ήταν αυτός που παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα εκχύλισης ανθοκυανών (AE%) στο γλεύκος που πιθανώς οφείλεται στην αναλογία φλοιού προς σάρκα. Οι δύο κλώνοι δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τις ταννίνες φλοιών και γιγάρτων. Παρόλα αυτά, ο οίνος του κλώνου 19 εμφάνισε υψηλότερο φαινολικό φορτίο (ΔΦΟ και μέθοδος Folin Ciocalteu) και υψηλότερη συγκέντρωση κατεχίνης και με τις δύο μεθόδους (BSA και MCP). Σε συμφωνία έρχεται το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης ως προς το

φαινολικό φορτίο και τη συγκέντρωση κατεχίνης του κλώνου 19, σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της μελέτης που πραγματοποιήθηκε την προηγούμενη χρονιά. Ο οίνος του κλώνου 19 ήταν, επίσης, αυτός, που εμφάνισε υψηλότερη χρωματική ένταση, τιμή έγχρωμων συστατικών παρουσία θειώδους αλλά και ανθοκυανών (με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης) εν συγκρίσει με τον οίνο E2-E30.

Η κλωνική επιλογή είναι πιο επίκαιρη από ποτέ καθώς κρίνεται απαραίτητα η ταυτοποίηση ποικιλιών αμπέλου σε επίπεδο κλώνου προκειμένου να καταστεί εφικτός ο έλεγχος του φυτικού υλικού και η επιλογή του κλώνου, ως προς την ποικιλιακή του ταυτότητα και την φυτοϋγειονομική του κατάσταση. Μέσω της κλωνικής επιλογής δημιουργούνται οι προϋποθέσεις εκείνες που θα προσδώσουν μακροπρόθεσμα στο προϊόν σταθερή και αναβαθμισμένη παραγωγή και σαφή ποικιλιακή ταυτότητα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Μέσω της παρούσας μελέτης, δίνεται η δυνατότητα μιας πρώτης προσέγγισης του θέματος των ποιοτικών χαρακτηριστικών οίνων και σταφυλών κλώνων των πέντε βασικότερων ελληνικών ποικιλιών. Με βάση τα συνδυαστικά αποτελέσματα των δύο συναπτών ετών που πραγματοποιήθηκε η μελέτη (2018 και 2019) για την ποικιλία Ασύρτικο ο κλώνος E16 και για τις ποικιλίες Μοσχοφίλερο και Ροδίτη οι κλώνοι E-21 και 02-E1-E21, αντίστοιχα, εμφάνισαν μικρότερη τάση για οξειδωση. Σχετικά με τις ερυθρές ποικιλίες, ο κλώνος 41-E47 παρουσίασε τόσο στις ράγες όσο και στους οίνους καλύτερο ανθοκυανικό προφίλ όμως, ως προς το φαινολικό φορτίο πλουσιότερος παρουσιάζεται ο κλώνος 03-E40. Τέλος, για την ποικιλία Ξινόμαυρο οι ράγες και οι οίνοι του κλώνου 19, εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα τόσο ανθοκυανών όσο και φαινολικών συστατικών.

Εν κατακλείδι, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ των κλώνων των υπό μελέτη ποικιλιών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο στη διερεύνηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών κλώνων ποικιλιών με απώτερο στόχο την εφαρμογή κλωνικής επιλογής. Η διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων θα πρέπει να επαναληφθεί κατά τα επόμενα έτη. Ιδιαίτερως σημαντική είναι και η ανάλυση των οίνων ως προς τα πτητικά τους συστατικά καθώς και η οργανοληπτική αξιολόγηση των οίνων ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη, ή μη, σύνδεσης των αποτελεσμάτων των χημικών αναλύσεων με το οργανοληπτικό προφίλ των οίνων.

## Παράρτημα

Πίνακας I Αφομοιώσιμο άζωτο ραγών (YAN)

Κλώνος	Αμμωνιακό άζωτο (mg N/L)	Οργανικό άζωτο (mg N/L)	YAN (mg N/L)
AG40	14.70±0.19 a	111.5±0.7 a	126.1±0.8 a
AG47	24.00±0.15 b	186.7±2.7 b	210.7±1.7 b
AS11	48.90±0.17 a	274.7±2.6 a	323.3±1.8 a
AS16	33.50±0.15 b	145.5±0.9 b	180.0±0.6 b
M26	47.20±0.15 a	115.2±1.0 a	162.4±1.2 a
M27	42.70±0.20 b	110.6±0.8 b	153.3±1.1 b
R16	31.60±0.12 a	217.2±1.6 a	248.8±0.6 a
R21	23.90±0.15 b	111.7±0.3 b	135.6±1.6 b
J19	33.90±0.12 b	75.2±0.2 b	108.0±0.9 a
J30	36.20±0.10 a	114.6±1.2 a	150.0±0.2 b

Πίνακας II Ολικές ανθοκυάνες και φαινολικά συστατικά (μέθοδος Pand)

Κλώνος	Βάρος 50 ραγών (g)	Βάρος ανά ράγα (g)	Ανθοκυάνες (mg/L)
AG40	137.2	2.7	2.5±0.0 a
AG47	109.0	2.2	2.3±0.1 b
J19	116.7	2.3	1.4±0.1 a
J30	126.3	2.5	1.3±0.1 b

Κλώνος	Ανθοκυάνες (mg/ g ράγας)	Ολικά φαινολικά (AU/ράγα)	Ολικά φαινολικά (AU/ g ράγας)
AG40	0.02±0.0 a	2.80±0.0 a	0.020±0.0 a
AG47	0.02±0.0 b	3.11±0.0 b	0.028±0.0 b
J19	0.01±0.0 a	2.59±0.1 a	0.021±0.0 a
J30	0.01±0.0 b	2.73±0.0 b	0.023±0.0 a



Πίνακας III Προσδιορισμός της εκχυλισματικότητας των ανθοκυανών, περιεκτικότητας ταννινών και του φαινολικού δυναμικού των ραγών (μέθοδος *Glories*)

Κλώνος	Ολικές ανθοκυάνες (g/L)	Εκχυλίσιμες ανθοκυάνες (g/L)	Εκχυλισιμότητα ανθοκυανών (%)
AG40	0.41±0.02 a	0.22±0.01 a	47.4±1.1 a
AG47	0.35±0.01 b	0.21±0.01 a	37.8±1.1 b
J19	0.16±0.01 a	0.13±0.00 a	16.1±1.1 a
J30	0.19±0.00 b	0.10±0.00 b	46.8±1.2 b

Κλώνος	Ταννίνες φλοιών (g/L)	Ταννίνες γιγάρτων (g/L)	Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (AU)
AG40	8.7±0.3 a	12.7±0.71 a	21.4±0.4 a
AG47	8.6±0.1 a	10.7±0.5 b	19.3±0.4 b
J19	5.2±0.1 a	11.3±0.2 a	16.5±0.2 a
J30	4.1±0.1 b	9.3±1.1 b	13.3±1.1 b

Πίνακας IV Κλασσικές αναλύσεις στους οίνους

Κλώνος	Ολική οξύτητα (g τρυγικού/L)	Ενεργός οξύτητα (pH)	Πτητική Οξύτητα (g οξικού οξέος/L)
AG40	5.0±0.0 a	3.46±0.01 a	0.60±0.01 a
AG47	4.4±0.1 b	3.75±0.01 b	0.68±0.00 b
AS11	5.9±0.0 a	3.10±0.01 a	0.57±0.00 a
AS16	6.6±0.1 b	2.95±0.01 b	0.54±0.02 b
M26	6.2±0.1 a	3.09±0.01 a	0.41±0.01 a
M27	6.2±0.1 a	3.10±0.01 a	0.43±0.01 b
R16	5.7±0.1 a	3.06±0.01 a	0.37±0.01 a
R21	5.9±0.1 b	3.00±0.01 b	0.47±0.01 b
J19	6.1±0.1 b	3.13±0.01 b	0.53±0.02 a
J30	6.5±0.1 a	3.19±0.01 a	0.58±0.02 b

<b>Κλώνος</b>	<b>Ανάγοντα σάκχαρα (g /L)</b>	<b>Αλκοολικός τίτλος (% vol)</b>
AG40	1.54±0.04 a	12.8±0.1 a
AG47	1.79±0.03 b	12.9±0.1 a
AS11	2.04±0.06 a	13.6±0.0 a
AS16	2.27±0.03 b	14.0±0.1 b
M26	0.89±0.04 a	13.0±0.1 a
M27	0.90±0.02 a	13.3±0.1 b
R16	1.28±0.02 a	11.3±0.1 a
R21	0.90±0.04 b	12.5±0.1 b
J19	1.81±0.04 b	12.2±0.1 b
J30	2.11±0.01 a	13.3±0.2 a

*Πίνακας V Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) στους οίνους*

<b>Κλώνος</b>	<b>Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) (AU)</b>
AG40	30.0±0.8 a
AG47	30.0±0.8 a
AS11	16.0±0.0 a
AS16	18.6±0.1 b
M26	15.2±0.1 a
M27	17.5±0.2 a
R16	17.5±0.2 a
R21	14.3±0.2 b
J19	35.6±0.6 b
J30	30.4±0.5 a

Πίνακας VI Ολικά φαινολικά συστατικά (Folin Ciocalteu) στους οίνους

Κλώνος	Δείκτης Φαινολικών Ουσιών (ΔΦΟ) (AU)
AG40	1.86±0.20 a
AG47	1.83±0.17 a
AS11	0.67±0.02 a
AS16	0.50±0.02 b
M26	0.47±0.02 a
M27	0.47±0.01 a
R16	0.50±0.05 a
R21	0.45±0.02 a
J19	2.14±0.04 b
J30	1.47±0.07 a

Πίνακας VII Ταννίνες με πρόσδεση από πρωτεΐνες (BSA)

Κλώνος	Συγκέντρωση κατεχίνης (mg/L)
AG40	60.1±4.4 a
AG47	33.2±2.3 b
J19	143.5±8.3 a
J30	78.3±10.1 b

Πίνακας VIII Ταννίνες με κατακρήμνιση από μέθυλ-κυτταρίνη (MCP)

Κλώνος	Συγκέντρωση κατεχίνης (g/L)
AG40	2.33±0.25 a
AG47	2.23±0.32 a
J19	2.28±0.09 a
J30	2.05±0.06 b

Πίνακας IX Χρωματικά χαρακτηριστικά (ένταση και απόχρωση) των οίνων

Κλώνος	Ένταση (AU)	Απόχρωση (AU)
AG40	4.10±0.00 a	0.75±0.02 a
AG47	4.40±0.10 b	0.97±0.00 b
AS11	0.10±0.01 a	0.10±0.01 a
AS16	0.11±0.00 a	0.11±0.00 a
M26	0.12±0.01 a	0.12±0.01 a
M27	0.13±0.01 a	0.13±0.01 a
R16	0.19±0.00 a	0.19±0.00 a
R21	0.13±0.01 a	0.13±0.01 a
J19	4.83±0.06 b	0.65±0.01 b
J30	3.53±0.06 a	1.64±0.05 a

Πίνακας X Χρωματικοί δείκτες Somers

Κλώνος	Χημική ηλικία 1	Χημική ηλικία 2	Βαθμός Ιονισμού ανθοκυανών (%)
AG40	0.25±0.01 a	0.02±0.01 a	17.9±0.6 a
AG47	0.26±0.01 a	0.01±0.00 b	15.5±0.4 a
J19	0.34±0.01 a	0.02±0.00 a	23.8±0.4 a
J30	0.35±0.01 a	0.02±0.00 a	26.7±4.9 a

Κλώνος	Ολικές ανθοκυάνες (mg/L)	Ένταση (AU)	Απόχρωση (AU)
AG40	273.0±2.7 a	4.7±0.1 a	0.59±0.01 a
AG47	232.3±2.1 b	4.3±0.1 b	0.83±0.01 b
J19	143.8±2.5 a	3.5±0.1 a	0.64±0.01 a
J30	70.0±11.5 b	2.3±0.1 b	0.97±0.04 b

Κλώνος	Ένταση (διορθωμένη SO <sub>2</sub> ) (AU)	Ολικά φαινολικά συστατικά (AU)	Έγχρωμα συστατικά παρουσία SO <sub>2</sub> (AU)
AG40	4.6±0.1 a	42.0±0.2 a	0.68±0.03 a
AG47	4.1±0.1 b	35.6±0.5 b	0.73±0.04 b
J19	3.3±0.1 a	25.9±0.1 a	0.67±0.02 a
J30	2.1±0.1 b	19.3±0.2 b	0.39±0.01 b

Πίνακας XI Ανθοκυάνες με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Κλώνος	Δελφινιδίνη (mg ισοδύναμων μαλβιδίνης/ L)	Πετουνιδίνη (mg ισοδύναμων μαλβιδίνης/ L)	Πεονιδίνη (mg ισοδύναμων μαλβιδίνης/ L)
AG40	1.22±0.05 a	4.12±0.08 a	2.91±0.39 a
AG47	0.36±0.18 b	1.69±0.58 b	0.95±0.04 b
J19	0.28±0.06	1.38±0.08 a	1.27±0.18 a
J30	nd	0.30±0.17 b	0.89±0.21 b

Κλώνος	Μαλβιδίνη (mg μαλβιδίνης/ L)	Οξικός εστέρας μαλβιδίνης (mg ισοδύναμων μαλβιδίνης/ L)	Κουμαρικός εστέρας μαλβιδίνης (mg ισοδύναμων μαλβιδίνης/ L)
AG40	131.95±5.31 a	3.93±1.28 a	13.10±0.61 a
AG47	110.13±12.33 b	4.35±1.57 b	11.28±0.39 b
J19	48.17±7.45 a	5.22±1.63 a	7.56±1.46 a
J30	22.43±6.95 b	2.14±0.94 b	2.59±1.07 b

*Πίνακας XII Τεστ ταχείας αμαύρωσης*

<b>Κλώνος</b>	<b>Ρυθμός μεταβολής χρώματος</b>	<b>Μεταβολή χρώματος (%)</b>
AS11	0.098±0.01 a	126.3±1.1 a
AS16	0.062±0.00 b	83.6±0.8 b
M26	0.018±0.00 a	31.1±0.5 a
M27	0.006±0.00 b	17.2±0.9 b
R16	0.021±0.01 a	42.5±1.4 a
R21	0.003±0.00 b	12.3±0.6 b

## Βιβλιογραφία

### Ελληνική Βιβλιογραφία

Καλλίθρακα Σ., 2017. Σημειώσεις Οργανοληπτικού Ελέγχου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.

Κανελλοπούλου Ι., 2015. Μελέτη του μέσου βαθμού πολυμερισμού τανινών σε φλοιούς και γίγαρτα της ποικιλίας Αγιωργίτικο από τέσσερις υποζώνες της περιοχής της Νεμέας για τα έτη 2012-2013-2014. Μεταπτυχιακή μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κοτσερίδης Γ., 2017. Σημειώσεις Οινολογίας Ι, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.

Κουνδουράς Σ., 2017. Σημειώσεις Αμπελουργίας για Οινολόγους, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.

Κουράκου–Δραγώνα Σ., 1998. Θέματα Οινολογίας, Επιστήμη και Τεχνολογία στον τομέα της οινοποιητικής τεχνικής, Εκδόσεις Τροχαλία, Αθήνα.

Μπινιάρη Α., 2012. Η κλωνική επιλογή αμπέλου, Πρακτικά 1ης Αμπελουργικής Συνάντησης, Καπανδρίτι.

Νικολάου Ν., 2012. Αμπελογραφία. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Σαββίδης Σ., 2009. Κλωνική επιλογή αμπέλου. Αγρότης, 55-57.

Σουφλερός Ε, 2000. Οινολογία. Εκδόσεις Σταμούλη, Θεσσαλονίκη.

Σταύρακας Δ., 2011. Αμπελογραφία (1η Έκδοση). Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.

Σταυρακάκης Μ., 1999. Σημειώσεις Ειδικής Αμπελουργίας ΙΙ. Θέματα αμπελογραφίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Αθήνα.

Σταυρακάκης Μ., 2010. Αμπελογραφία. Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα.

Σταυρακάκης Μ., 2013. Αμπελουργία. Εκδόσεις Τροπή, Αθήνα.

Τσακίρης Α., 1994. Οινολογία. Εκδόσεις Ψυχάλου, Αθήνα.

Υπουργική Απόφαση 1847/60594/2016 - ΦΕΚ 1599/Β/7-6-2016, Άρθρο 2

Χαρβαλιά Α. και Μπενά-Τζούρου Ε., 1982. Τα φαινολικά συστατικά και το χρώμα των ελληνικών οίνων, Ελληνικά Οινολογικά χρονικά, Ινστιτούτο Οίνου, Αθήνα.

### **Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία**

Arozarena I., Casp A., Marin R., Navarro M., 2000. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1909-1917.

Baldi A., Romani A., Mulinacci N., Vincieri F., Caseta B., 1995. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2104-2109.

Bavaresco L., Pezzutto S., Gatti M., Mattivi F., 2007. Role of the variety and some environmental factors in grape stilbenes. *Vitis*, 46:57-61.

Bavaresco L., Pezzutto S., Ragga A., Ferrari F., Trevisan M., Effect of nitrogen supply on trans-resveratrol concentration in berries of *V. vinifera* L cv Cabernet sauvignon. *Vitis*, 40:229-230.

Bavaresco L., Mattivi F., Rosso M., Flamini R., 2012. Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12:1366-1381.

Boulton R., 2001. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52.

Brillante L., Tomasi D., Gaiotti F., Giacosa S., Torchio F., Segade S., Siret R., Zouid I., Rolle L., 2015. Relationships between skin flavonoid content and berry physical-mechanical properties in four red wine grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 197:272-279.

<https://www.sciencedirect.com/science/journal/03044238> \o "Go to Scientia Horticulturae on ScienceDirect



Brouillard R., 1982. Chemical structure of anthocyanins. Edition: Anthocyanins as food colors. Academic Press, New York.

Brouillard R., Chssaing S., Fougerousse A., 2003. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is that red wine color lasts so long?. *Phytochemistry*, 64:1179-1186.

Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A., 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem Syst Ecol*, 27:445-459.

Castellarin S., Bavaresco L., Falginella L., Gonçalves M. and di Gaspero G., 2012. Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants. Editors: Gerós H., Chaves M., Delrot S., Bussum, Netherlands.

Castillo-Munoz N. , Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I., 2007. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:992-1002.

Carrera C., Ruiz Rodriguez A., Palma M., Barroso C., 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732:100-104.

<https://www.sciencedirect.com/science/journal/00032670> \o "Go to Analytica Chimica Acta on ScienceDirect

Cheynier V., Duenas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J., Sarni-Manchado P., Fulcrand H., 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57:298-305.

Cheynier V., Rigaud J., Souquet J., Duprat F., Moutounet M., 1990. Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41:346-349.

Clarke J. and Bakker J., 2004. Wine flavor chemistry. Blackwell Pub. Oxford, UK.

Coombe B. and Dry P., 1992. Viticulture. Volume 2. Practices. Winetitles, Adelaide.

Conde C., Silva P., Fontes., Dias A., Tavares R., Sousa M., Agasse A., Delrot S., Geros H., 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food (Global Science Book)*, 1:1-22.

Czochanska Z., Foo Y., Newman R., Porter L., Thomas W., Jones W., 1979. Direct proof of a homogeneous polyflavan-3-ol structure for polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 55:465.

Delgado R., Martin P., Alamo M., Gonzalez M., 2004. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilization rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:623-630.

Downey M., Dokoozlian N., Krstic M., 2006. Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A review of Recent Research ASEV 2005 Phenolics Symposium. *American Journal of Enology and Viticulture* 57:257-268.

Dukes B. and Butzke C., 1998. Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49:125-134.

Esteban M., Villanueva M., Lissarrague J., 2001. Effects of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:409-420.

Fanzone M., Zamora F., Jofre E., Assof F., Pena-Neira A., 2011. Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:6120–6136.

Ferrer-Gallego R., Brás N., García-Estévez I., Mateus N., Rivas-Gonzalo J., Freitas V., Escribano-Bailón M., 2016. Effect of flavonols on wine astringency and their interaction with human saliva. *Food Chemistry*, 209:358-364.

Flanzy M. and Poux C., 1958. *Annals of Agricultural Sciences*, 7:377.

Gawel R., 1998. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4:74-95.

Gawel R., 1997. The use of language by trained and untrained experienced wine tasters. *Journal of sensory studies*, 12:267-284.

- Glories Y., 1984. La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation. *Vigne Vin*, 18:253-271.
- Gonzalez-Manzano S., Rivas-Gonzalo C., Santos-Buelga C., 2003. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513:283-289.
- Harbertson J., Picciotto E., Adams D., 2003. Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54:301-306.
- Harrison R., 2018. Practical interventions that influence the sensory attributes of red wines related to the phenolic composition of grapes: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 53:3–18.
- Heimer D., Romani A., Ieri F., 2017. Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: A review. *European Food Research and Technology*, 243:1107-1115.
- Henschke, P. and Jiranek V., 1993. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. *Wine microbiology and biotechnology*. Edition: Fleet G., London.
- Iland P., Bruer N., Wilkes E., Edward G., 2004. Anthocyanins (colour) and total phenolics of grape berries. *Chemical Analysis of Grapes and Wine: Techniques and Concepts* (1st edition). Winetitles: Broadview, Australia.
- Jackson D. and Lambard P. 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44:409-430.
- Jackson R., 2008. *Wine Science: Principles, Practice, Perception* (3rd edition). Academic Press, San Diego.
- Jackson R., 2009. *Wine Tasting: A Professional Handbook* (2nd edition). Food Science and Technology, International Series.
- Kallithraka S., Arvanitoyannis I., El-Zajouli A., Kefalas P., 2001. The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry*, 75:355–363.

- Kallithraka S., Mohdaly A., Makris D., Kefalas P., 2004. Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:375-386.
- Kallithraka S., Tsaoutsouras E., Tzourou E., Lanaridis P., 2005. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chemistry*, 99:784-793.
- Keller M. and Hrazdina G., 1998. Interaction of Nitrogen Availability During Bloom and Light Intensity During Veraison II. Effects on Anthocyanin and Phenolic Development During Grape Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49:341-349.
- Kennedy J., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E., Jones G., 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:5348-5355.
- Koundouras S., Marinos V., Gkoulioti A., Kotseridis Y., Van Leeuwen C., 2006. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of non-irrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.) effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:5077-5086.
- Lacombe T., Boursiquot J.-M., Audeguin L., 2004. Prospection, conservation et évaluation des clones de vigne en France. *Bulletin de l'OIV*, 885-886:799-809.
- Lanaridis P. and Bena-Tzourou E., 1997. Etude des variations des anthocyanes pendant la maturation des raisins de cinq cépages rouges, cultivés en Grèce. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 4:205-212.
- Lee J., Skinkis P., 2012. Oregon 'Pinot noir' grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chemistry*, 139:893-901.
- Makris D., Kallithraka S., Mamalos A., 2006. Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta*, 70:1143-1152.
- Matthews M. and Anderson M., 1988. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39:313-320.

Monagas M. and Bartolome B., 2009. Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. Wine Chemistry and Biochemistry. Editors Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C.

Monagas M., Bartolome B., Gomez-Cordoves C., 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:85–118.

Navarro M., Kontoudakis N., Giordanengo T., Gomez-Alonso S., Garcia-Romero E., Fort F., 2016. Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content. *Food Chemistry*, 199:822–827.

Nichols-Orians C., 1991. Differential effects of condensed and hydrolyzable tannin on polyphenol oxidase activity of attine symbiotic fungus. *Journal of Chemical Ecology*, 17:1811–1819.

Noble A., Arnold R., Buechsenstein J., Leach E., Schmidt J., Stern P., 1987. Modification of a Standardized System of Wine Aroma Terminology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38:143-146.

[https://www.researchgate.net/journal/00029254\\_American\\_Journal\\_of\\_Enology\\_and\\_Viticulture](https://www.researchgate.net/journal/00029254_American_Journal_of_Enology_and_Viticulture) \t "\_blank

OIV, 2017. Statistical report on world vitiviniculture, International Organisation of Vine and Wine, Intergovernmental Organisation, Paris.

Ojeda H., Andary C., Kraeva E., Carbonneau A., Deloire A., 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53:261-267.

Osrecak M., Karoglan M., Kozina B., Preiner D., 2016. Influence of leaf removal and reflective mulch on phenolic composition and antioxidant activity of Merlot, Teran and Plavac mali wines (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 209:261–269.

Orduna R., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43:1844–1855.

Pascali A., Coletta A., Del-Coco L., Basile T., Gambacorta G., Fanizzi P., 2014. Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chemistry*, 161:112–119.

Pietta G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63:1035-1042.

Rentzsch M., Wilkens A., Winterhalter P., 2009. Non-flavonoid Phenolic Compounds. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Editors Moreno-Arribas M.V.-Polo M.C.

Ribereau- Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., 2006. *Handbook of Enology 2 (2nd edition). The Chemistry of Wine. Stabilization and Treatments*, John Wiley and Sons Ltd.

Ribereau- Gayon P. and Stonestreet E., 1965. Determination of Anthocyanins in Red Wine. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 9:2649-2652.

Rodriguez-Pulido F., Hernandez-Hierro J., Nogales-Bueno J., Gordillo B., Gonzalez-Miret L., Heredia F., 2014. A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. *Talanta*, 122:145-150.

Santos-Buelga C. and Scalbert A., 2000 Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1094-1117. <https://www2.scopus.com/sourceid/33928?origin=recordpage> \o "Go to the information page for this source"

Sarneckis C., Damberg R., Jones P., Mercurio M., Herderich M., Smith P., 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12:39-49.

Scheiner D., 1976. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method. *Water Research*, 10:31-36.

Singleton L., 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, 8:1553-1558.

Singleton L and Kramling E., 1976. Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27:157-160.

Sioumis N., Kallithraka S., Makris P., Kefalas P., 2006. Kinetics of browning onset in white wines: Influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing. *Food Chem*, 94:98-104.

Teixeira A., Eiras-Dias J., Castellarin D., Gerós H., 2013. Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:18711–18739.

Terriern N., Poncet-Legrand C., Cheynier V., 2009. Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Edition Moreno-Arribas V. and Polo C., Madrid, Spain.

Vivas N. and Glories Y., 1996. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47:103–107.

Vidal S., Meudec E., Cheynier V., Skouroumounis G., Hayasaka Y., 2004. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:7144-7151.

Waterhouse A., 2002. *Wine Phenolics*. New York Academy of Sciences, 957:21–36.

Waterman P. and Mole S., 1994. *Analysis of plant metabolites*, P. G. Waterman and S. Mole, Eds., *Methods in Ecology Series*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Yilmaz Y., Göksel Z., Erdoğan S., Öztürk A., Atak A., Özer C., 2014. Antioxidant activity and phenolic content of seed, skin and pulp parts of 22 grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars (4 common and 18 registered or candidate for registration). *Journal of Food Processing and Preservation*, 39:1682–1691.

Zachova Z., Triska J., Vrchotova N., Balik J., Sajfrtova M., Sovova H., 2018. Combining high-pressure methods for extraction of stilbenes from grape cane. *The Journal of Supercritical Fluids*. 142:38-44.

<https://www.sciencedirect.com/science/journal/08968446> \o "Go to The Journal of Supercritical Fluids on ScienceDirect